

# IONENKANÄLE IN ERREGBAREN MEMBRANEN

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Leander Lauffer  
aus Konstanz

im Februar 1983







# IONENKANÄLE IN ERREGBAREN MEMBRANEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Leander Lauffer**

aus Konstanz

im Februar 1983

1. Referent: Prof. Dr. F. Hucho

2. Referent: Prof. Dr. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. März 1983

Die vorliegende Arbeit wurde bei Prof. F. Hucho im Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Teilergebnisse sind veröffentlicht:

Lauffer, L., Stengelin, S., Hucho, F. (1980) Binding of anemone toxin I (ATX I) to whole crayfish nerves and axonal membrane fractions is voltage dependent and can be competitively displaced by ATX II and III; Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 1311-1312

Hucho, F., Lauffer, L. (1982) Interaction of anemone toxin I with crayfish nerve membranes. *Toxicon* 20, 70-71

Lauffer, L., Hucho, F. (1982) Triphenylmethylphosphonium is an ion channel ligand of the nicotinic acetylcholine receptor; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79, 2406-2409

Lauffer, L. (1982) Triphenylmethylphosphonium: a new ion channel ligand of the nicotinic acetylcholine receptor; in: "Neuroreceptors", Hrsg. Hucho, F., de Gruyter, Berlin, 289-304

Lauffer, L., Hucho, F. (1981) Stimulation of triphenylmethylphosphonium-accumulation in acetylcholine receptor-rich membrane vesicles by cholinergic effectors; Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1310-1311

Muhn, P., Lauffer, L., Hucho, F. (1982) (<sup>3</sup>H)Methyltriphenylphosphonium as a reversible and irreversible ligand for the ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor; Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, 1311

Muhn, P., Lauffer, L., Hucho, F. (1983) The acetylcholine receptor and its ion channel; in: "Mobility and Recognition in Cell Biology", Hrsg. Sund, H., Veeger, C., de Gruyter, Berlin, 393-407



Recent neurological research indicates  
that the brain is governed by principles  
it cannot understand.

Tom Robbins

"Even Cowgirls Get the Blues"



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                      | Seite |
|----------------------------------------------------------------------|-------|
| A EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG                                     | 1     |
| 1 Einleitung                                                         | 1     |
| 1.1 Reizverarbeitende Systeme                                        | 1     |
| 1.2 Aktionspotential und chemische Synapse                           | 4     |
| 1.2.1 Der spannungsabhängige Natriumkanal                            | 8     |
| 1.2.1.1 Neurotoxine als Werkzeuge zur Untersuchung des Natriumkanals | 10    |
| 1.2.1.1.1 Kanalblockierende Toxine                                   | 11    |
| 1.2.1.1.2 Lipidlösliche Toxine                                       | 13    |
| 1.2.1.1.3 Peptidtoxine                                               | 14    |
| 1.2.1.2 Molekulare Eigenschaften des Natriumkanals                   | 17    |
| 1.2.2 Der Acetylcholinrezeptor-Komplex der postsynaptischen Membran  | 21    |
| 1.2.2.1 Untersuchungen am AChR <u>in vivo</u>                        | 21    |
| 1.2.2.2 Molekulare Eigenschaften des AChR                            | 24    |
| 1.2.2.3 Lokalanästhetika und der Ionenkanal des AChR-Komplexes       | 28    |
| 1.3 Einige Bemerkungen zu Ionenkanälen                               | 32    |
| A 2 Problemstellung                                                  | 34    |
| B EIGENE EXPERIMENTE                                                 | 35    |
| 1 Untersuchungen am Natriumkanal                                     | 35    |
| 1.1 Radioaktive Markierung von ATX I                                 | 35    |
| 1.2 Untersuchungen am ganzen Nerven                                  | 38    |
| 1.2.1 Bindungsversuche mit $^{125}\text{I}$ -ATX I                   | 39    |

|                                                                                               | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.2.2 ATX II und ATX III als Inhibitoren der $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung                  | 41    |
| 1.2.3 Erhöhung der externen Kaliumkonzentration inhibiert $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung     | 43    |
| 1.2.4 Diskussion der Ergebnisse                                                               | 45    |
| 1.3 Untersuchungen an axonalen Membranfragmenten                                              | 47    |
| 1.3.1 Präparation axonaler Membranfragmente                                                   | 47    |
| 1.3.2 Bindung von $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente                         | 53    |
| 1.3.2.1 Entwicklung des Bindungstests                                                         | 53    |
| 1.3.2.2 Anwendung des Bindungstests                                                           | 59    |
| 1.3.2.3 Diskussion der Ergebnisse                                                             | 69    |
| 1.3.3 Versuche zur kovalenten Markierung der $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindungsstelle           | 72    |
| 1.3.3.1 Bifunktionelle Reagenzien                                                             | 74    |
| 1.3.3.2 Anregung durch UV-Licht                                                               | 82    |
| 1.3.4 Diskussion der Ergebnisse                                                               | 87    |
| B 2 Untersuchungen am Ionenkanal des AChR-Komplexes                                           | 90    |
| 2.1 Spannungsabhängige Akkumulierung von $^3\text{H}$ -TPMP <sup>+</sup>                      | 90    |
| 2.2 $^3\text{H}$ -TPMP <sup>+</sup> als Ligand des Ionenkanals                                | 94    |
| 2.2.1 Einfluß cholinergischer Liganden auf die $^3\text{H}$ -TPMP <sup>+</sup> -Bindung       | 94    |
| 2.2.2 Spezifische Bindung von $^3\text{H}$ -TPMP <sup>+</sup>                                 | 99    |
| 2.2.3 TPMP <sup>+</sup> und $^3\text{H}$ -ACh-Bindung                                         | 102   |
| 2.2.4 TPMP <sup>+</sup> blockiert $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux aus AChR-reichen Membranvesikeln | 104   |

|                                                                                                         | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.2.5 TPMP <sup>+</sup> und Lokalanästhetika                                                            | 107   |
| 2.2.6 Diskussion der Ergebnisse                                                                         | 111   |
| B 3 Zusammenfassung der Ergebnisse                                                                      | 117   |
| C MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN                                                                         | 118   |
| C 1 Material und Geräte                                                                                 | 118   |
| C 2 Methoden                                                                                            | 121   |
| 2.1 Radioaktive Markierung von ATX I mit <sup>125</sup> I                                               | 121   |
| 2.2 Präparation axonaler Membranfragmente aus Krebsgehnerven                                            | 121   |
| 2.3 Präparation AChR-reicher Membranfragmente aus <u>Torpedo</u> -Electroplaques                        | 122   |
| 2.4 Bindungsversuche                                                                                    | 124   |
| 2.4.1 Einiges zur Theorie                                                                               | 124   |
| 2.4.1.1 Der einfache Fall                                                                               | 124   |
| 2.4.1.2 Bindung in Gegenwart eines kompetierenden Liganden                                              | 129   |
| 2.4.2 <sup>125</sup> I-ATX I-Bindung an ganze Krebsnerven                                               | 133   |
| 2.4.3 <sup>125</sup> I-ATX I-Bindung an axonale Membranfragmente                                        | 133   |
| 2.4.4 <sup>3</sup> H-TPMP <sup>+</sup> - und <sup>3</sup> H-PCP-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente | 134   |
| 2.4.5 <sup>3</sup> H-ACh-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente                                        | 134   |
| 2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                                                                  | 136   |
| 2.6 <sup>22</sup> Na <sup>+</sup> -Efflux aus AChR-reichen Membranvesikeln                              | 137   |
| 2.7 Proteinbestimmung nach der Folin-Methode                                                            | 139   |
| 2.8 Messung der Na/K-ATPase-Aktivität                                                                   | 139   |
| LITERATUR                                                                                               | 142   |
| Anhang: Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen                                                 | 152   |



A            EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

A 1           Einleitung

A 1.1        Reizverarbeitende Systeme

Jedes höhere Lebewesen besteht aus vielen Milliarden einzelner Zellen. Grundvoraussetzung für das "Funktionieren" eines solchen Zellverbandes ist ein geordnetes Zusammenwirken, dieses wiederum kann nur erreicht werden durch eine mögliche Kommunikation zwischen einzelnen Zellen. Darüberhinaus ist die Fähigkeit zur Kommunikation im vielzelligen Organismus unabdingbare Voraussetzung für die Rezeption von Umweltreizen, deren Verarbeitung sowie für eine differenzierte Reaktion.

Selbstverständlich muß auch ein Einzeller auf seine Umwelt reagieren können; sehr wichtig z.B. ist die Fähigkeit, Nahrungspartikel oder -moleküle zu erkennen. Wahrscheinlich haben sich schon sehr früh in der Evolution Strukturen auf der Oberfläche der Zelle, der Zellmembran, ausgebildet, deren Kontakt mit Molekülen bestimmter Charakteristik die Zelle zur Nahrungsaufnahme mittels endocytotischer Vorgänge veranlaßte.

Dieses Konzept wurde dann auch im höheren Organismus in verfeinerter Form für den Aufbau des Hormonsystems genutzt.

Das Hormonsystem dient dazu, die Leistungen der einzelnen Organe aufeinander abzustimmen. Steuereinheiten



wie Drüsen oder auch nur einzelne Drüsenzellen scheiden Botenstoffe, eben die Hormone, aus; diese werden auf dem Blutweg im Körper verteilt und von den Zielzellen mit Erkennungsmolekülen, den Rezeptoren, gebunden. Rezeptoren sind Proteine oder Proteinkomplexe, die in der Zellmembran verankert sind und die die Bindung ihres spezifischen Liganden in einen Effekt umsetzen. Dieses Signal bewirkt je nach Zielzelle unterschiedliche Antworten, wobei molekulare bzw. physikalische Identität des Signals sowie seine Wirkungsweise Gegenstände intensiver Forschung waren und sind.

Die hormonelle Informationsübertragung leidet jedoch unter zwei grundsätzlichen Nachteilen: zum einen geschieht sie relativ langsam, die Botenstoffe müssen erst mit dem Blutstrom verteilt werden, zum anderen ist sie relativ unspezifisch: jede Zelle mit entsprechenden Rezeptor wird von den einmal ausgeschütteten Hormonmolekülen gleichermaßen erreicht.

Diese Nachteile werden überwunden vom anderen Kommunikationssystem, das der höhere Organismus besitzt: das Nervensystem. Seine Bestandteile, die Nervenzellen oder Neuronen, besitzen ganz bestimmte morphologische Eigenschaften: sie bestehen aus einem Zellkörper, dem Soma oder Perikaryon, aus vielen kleinen Fortsätzen, den Dendriten und einem bis zu meterlangen Fortsatz, dem Axon, das sich in Kollaterale verzweigen kann. Die Funktion der Nervenzellen beruht auf einem Phänomen, das fast allen Zellen eigen ist: zwischen Zellinnerem und -äußerem herrscht elektrische Spannung, das sogenannte Membranpotential. Es rührt her von der Ungleichverteilung verschiedener Ionen im Innen- und

Außenmedium (s.u.). Normalerweise wird es von der Zelle ziemlich konstant gehalten, beim Riesenaxon des Tintenfisches z.B. beträgt es ca. -60 mV (innen negativ).

Nervenzellen besitzen nun eine Eigenschaft, die sie nur noch mit einigen Muskelzellen teilen: kurzzeitige Erniedrigung des Membranpotentials (Depolarisation) führt bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes spontan zu weiterer Depolarisation. Das Membranpotential kann dabei sogar positive Werte annehmen; darauf folgt ebenfalls spontan die Rückkehr zum Ausgangszustand, dem Ruhepotential. Dieser Vorgang ist von immer gleicher Dauer und Amplitude und wird als Aktionspotential bezeichnet. Dieses pflanzt sich entlang der neuronalen Membran fort und ist das Mittel der intrazellulären Kommunikation im Nervensystem.

Orte interzellulären Kommunikation sind die Synapsen, die Kontaktstellen zwischen verschiedenen Zellen. Hier kann generell gesagt werden, daß die Signale vom Neuron über Dendriten oder Soma aufgenommen und über das Axon weitergegeben werden. Zwei Möglichkeiten der Impulsübertragung sind bekannt:

- a) bei der elektrischen Synapse sind die Membranen zweier Zellen fest miteinander verbunden, so daß ein ankommendes Aktionspotential direkt zur Depolarisierung der Nachbarzelle führt. Dieser Synapsentyp ist allerdings selten anzutreffen.
- b) weitaus häufiger ist die chemische Synapse. Hier liegt zwischen zwei Zellen der synaptische Spalt. Ein Aktionspotential führt zur Freisetzung von Botenstoffen, den Transmittermolekülen, aus der präsynapti-

schen Endigung; das elektrische Signal wird also zunächst in ein chemisches umgesetzt. Die Transmittermoleküle diffundieren durch den synaptischen Spalt und besetzen auf der postsynaptischen Membran spezifische Rezeptorproteine. Dieser Vorgang führt je nach Art der Synapse zu Depolarisierung oder Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran.

Die chemische Synapse dient nicht nur der Verbindung zur Kommunikation zwischen zwei Nervenzellen, sondern auch zwischen Nerven- und Muskelzelle. Im letzteren Fall spricht man von einer neuromuskulären Synapse.

Zwei Phänomene: elektrische Erregbarkeit und Signalübertragung von Zelle zu Zelle vor allem mittels chemischer Synapsen, sind also zentrale Funktionsprinzipien des Nervensystems. Was ihnen im Einzelnen zugrunde liegt, soll nun nachfolgend erörtert werden.

#### A 1.2 Aktionspotential und chemische Synapse

Grundlage für das Zustandekommen von Aktionspotentialen ist das Vorliegen eines Ruhepotentials. Dieses beruht, wie schon erwähnt, auf der ungleichen Verteilung bestimmter Ionen inner- und außerhalb der Zellmembran. Insbesondere liegen Natriumionen außen in höherer, Kaliumionen innen in höherer Konzentration vor. Die Zellmembran ist nun im Ruhezustand für Kaliumionen viel besser durchlässig als für Natriumionen, sie werden also entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten aus der Zelle austreten. Dies führt jedoch zu einer Verarmung an positiven Ladungen auf der Innenseite der Zellmembran; es entsteht ein elektrisches Potential, das der Bewegung der Kaliumionen entgegenwirkt.

Findet kein Nettofluß von Ionen mehr statt, ist das Kalium-Diffusionspotential erreicht.

Das Ruhepotential ist nur in erster Näherung ein Kalium-Diffusionspotential, da die Zellmembran in geringerem Maße auch für andere Ionen permeabel ist. So ist der Konzentrationsgradient für Natriumionen genau umgekehrt wie der für Kaliumionen; die passiv einströmenden Natriumionen erklären die gegenüber dem Kalium-Gleichgewichtspotential geringeren tatsächlichen Werte des Ruhepotentials. Eine vollständige Beschreibung des Ruhepotentials bedarf sowohl der unterschiedlichen Konzentrationen von Kalium-, Natrium- und Chloridionen als auch deren unterschiedlicher Permeabilität.

Während des Aktionspotentials nun ändern sich kurzzeitig die Permeabilitätsverhältnisse in der Membran vollständig.

Bei Depolarisation wird nach Überschreiten des Schwellenwertes die Natriumpermeabilität schlagartig auf ein Vielfaches erhöht, dies führt zu weitergehender Depolarisation. Erklärt wird dieses Phänomen durch das Öffnen von spannungsabhängigen Natriumkanälen, durch die Natriumionen einströmen können. Diese Kanäle schließen sich offensichtlich spontan wieder, sie "inaktivieren", was zusammen mit der zeitlich verzögerten Öffnung von Kaliumkanälen zur Repolarisation der Membran führt. Kaliumkanäle bleiben im Gegensatz zu Natriumkanälen während der gesamten Dauer der Depolarisation geöffnet, d.h. sie inaktivieren nicht. Eine Ionenpumpe, die Natrium/Kalium-abhängige ATPase, transportiert die eingeströmten Natriumionen wieder



präsynaptischer Membran und synaptischen Bläschen bzw. Vesikeln, der synaptische Spalt und die subsynaptische Membran. Ein ankommendes Aktionspotential führt zu Depolarisierung der präsynaptischen Membran, dieses bewirkt das Verschmelzen der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und zur Ausschüttung des in ihnen enthaltenen Transmitters in den synaptischen Spalt.

Es sei hier darauf hingewiesen, daß der oben beschriebene Ablauf noch nicht gesichert ist, sondern bisher nur als sogenannte "Vesikel-Hypothese" formuliert wurde. Viele Hinweise machen diese Hypothese jedoch sehr wahrscheinlich.

Einmal in den synaptischen Spalt gelangt, diffundieren die Transmittermoleküle sehr schnell hindurch und treffen auf die postsynaptische Membran, wo sie von den Rezeptorproteinen gebunden werden. Ein Funktionselement dieser Rezeptorproteine ist wiederum ein Ionenkanal, dessen Öffnung durch die Bindung des Transmittermoleküls stimuliert wird. Dies führt je nach Art der permeierenden Ionen zu Depolarisierung oder Hyperpolarisierung der postsynaptischen Membran.

In vielen Fällen inaktivieren spezielle Enzyme den Transmitter nach der Bindung, Transportsysteme nehmen den Transmitter oder dessen Bruchstücke wieder in die präsynaptische Endigung auf; andere Enzymsysteme synthetisieren den Transmitter dort neu. Man kennt heute eine ganze Reihe von Transmittermolekülen,

eines der bekanntesten ist das Acetylcholin. Jedoch können auch die Catecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie die Aminosäure  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) als Transmitter wirken und auch Glutamat und Serotonin (5-Hydroxytryptamin) werden Transmitterfunktionen zugeschrieben. Je nach Art des verwendeten Transmitters unterscheidet man zwischen z. B. cholinergen, adrenergen, gabaergen und anderen Synapsen.

Zwei der wichtigsten molekularen Einheiten für die Impulsfortleitung, der spannungsabhängige Natriumkanal der axonalen Membran sowie der postsynaptische Acetylcholinrezeptor-Komplex mit seinem chemisch regulierten Ionenkanal, sollen im folgenden näher beschrieben werden.

#### A 1.2.1

##### Der spannungsabhängige Natriumkanal

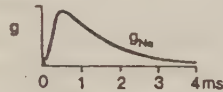
Hodgkin und Huxley waren die ersten, die eine quantitative Beschreibung der Vorgänge bei elektrischer Erregung in der neuronalen Membran liefern konnten (2).

Untersuchungsobjekt war das Riesenaxon des Tintenfisches, als Methode verwendeten sie die Spannungsklemme (engl. "voltage clamp"). Hierbei wird eine Elektrode in das Innere des Axons eingeführt, die andere befindet sich im umgebenden Bad. Mittels elektronischer Schaltungen wird nun die Spannung zwischen diesen beiden Elektroden konstant gehalten; Potentialänderungen werden auf diese Weise als Ströme gemessen.

Hodgkin und Huxley fanden im Verlauf des Aktionspotentials u.a. eine charakteristische Änderung der Natriumleitfähigkeit  $g_{Na}$  (Abb. 2).

Abb. 2:

Änderung der Natriumleitfähigkeit während eines Aktionspotentials.



Die gemessene Kurve läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$$

wobei  $g_{Na}$  die jeweilige Natriumleitfähigkeit,  $\bar{g}_{Na}$  die maximale Natriumleitfähigkeit,  $m$  und  $h$  dimensionslose Variable sind. Die beiden letzteren Größen beschreiben die spannungsabhängige Aktivierung ( $m$ ) und die spannungsabhängige Inaktivierung ( $h$ ) des Kanals.

Der Natriumkanal besitzt also einen Mechanismus, der für Öffnung und Schließung des Kanals sorgt: den Schleusen- oder "gating"-Mechanismus.

Eine andere Eigenschaft macht den Kanal erst zum Natriumkanal: der Durchtritt von Ionen ist selektiv, die Reihenfolge der Alkalimetallkationenpermeabilität z.B. ist  $Na^+ \approx Li^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$  (3). Dieses Funktionselement des Natriumkanals wird als Selektivitätsfilter bezeichnet.

Während elektrophysiologische Methoden viele Vorteile besitzen und u.a. den zeitlichen Ablauf der Änderung der oben beschriebenen Eigenschaften vollständig darzustellen erlauben, so finden sie doch auch ihre Begrenzungen: Untersuchungen zur molekularen Struktur der Funktionselemente (Schleuse und Filter) sind nur sehr allgemein durchzuführen, und bei vielen Systemen (Einzelzellen aus Zellkulturen, subzelluläre Membranfragmente) sind elektrophysiologische Methoden nur unter Schwierigkeiten oder gar nicht anwendbar.

Hier erlaubten vor allem tierische oder pflanzliche Toxine, deren Wirkung auf den Kanal zunächst von Elektrophysiologen gezeigt und definiert wurde, weitergehende Untersuchungen.

#### A 1.2.1.1 Neurotoxine als Werkzeuge zur Untersuchung des Natriumkanals

Die auf den Natriumkanal wirkenden Toxine werden im Allgemeinen nach Art ihrer molekularen Struktur bzw. Art ihres Effektes in drei Klassen aufgeteilt (5): Kanalblockierende Toxine, lipidlösliche Toxine und Peptidtoxine.

Verschiedene Übersichtsartikel (z.B. 4, 5) beschreiben ihre bisherige Anwendung.

#### A 1.2.1.1.1 Kanalblockierende Toxine

Vertreter dieser Gruppe sind Tetrodotoxin und Saxitoxin (Abb. 3).

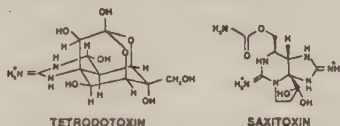


Abb. 3: Struktur von Tetrodotoxin und Saxitoxin

Beides sind Heterozyklen, gemeinsames Strukturmerkmal ist die Guanidiniumgruppe.

Tetrodotoxin (TTX) kommt in der Leber und den Ovarien des japanischen Fugu-Fisches vor, wird jedoch auch in einigen Arten von Molchen, Octopus und Fröschen gefunden.

Schon seit Anfang des Jahrhunderts ist bekannt, daß TTX die Impulsleitung in Motoneuronen blockiert (6). Spätere Versuche mit der voltage clamp-Methode zeigten, daß TTX den spannungsabhängigen Anstieg der Natriumpermeabilität blockiert, ohne jedoch Ruheleitfähigkeit oder spannungsabhängige Erhöhung der Kaliumpermeabilität zu beeinflussen (7, 8).

Wird das Toxin im Zellinneren appliziert, z.B. bei Perfusion des Riesenaxons des Tintenfisches, so zeigt es keine Wirkung (9): die Bindungsstelle ist also höchstwahrscheinlich auf der Außenseite der Membran lokalisiert.

Saxitonin ist ein Produkt von Dinoflagellaten der Gattung Gonyaulax und wird in Muscheln und anderen Meerestieren, die sich von diesen Organismen ernähren, gefunden; elektrophysiologische Untersuchungen zeigten für diese Verbindung einen TTX-ähnlichen Wirkungsmechanismus (10, 11).

Quantitative Studien über Art und Anzahl der Bindungsstellen konnten durchgeführt werden, nachdem TTX und später auch Saxitonin mit Hilfe der Wilzbach-Methode radioaktiv markiert (tritiiert) worden war (12). Nun wurden Anzahl der Bindungsstellen pro Membranflächen- oder Gewichtseinheit sowie deren Affinität in verschiedenen Nerven- und Muskelzellpräparationen bestimmt. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten liegen zwischen 1 und 10 nM (5), die Anzahl der Bindungsstellen ist jedoch sehr unterschiedlich: je nach Ausgangsmaterial wurden 30 (nicht myelinisierter Nerv) bis 12000 (Ranvier'scher Schnürring) pro  $\mu\text{m}^2$  gefunden (5). Die Bindung von TTX blockiert die von Saxitonin und umgekehrt, beide kompetieren um dieselbe Bindungsstelle. Die Natur dieser Bindungsstelle ist Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Die Bindung der Toxine ist nicht spannungsabhängig (13) und wird auch nicht von der anderer Toxine beeinflusst, die Aktivierung oder Inaktivierung des Kanals modifizieren (14). Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, daß sie den Ionenfluß direkt blockieren. Aus der pH-Abhängigkeit der Bindung wurde auf die Beteiligung einer Gruppe mit einem  $\text{pK}_a$  von ungefähr 5,4 geschlossen (15). Einer ähnlichen pH-Abhängigkeit ist auch der Ionenfluß unterworfen, bei Neuroblastomazellen wurden beide Parameter zusammen gemessen und übereinstimmende

Werte gefunden (16). Jedoch wäre es voreilig, aus diesen Experimenten auf eine einzige beteiligte Gruppe zu schließen, so haben z.B. die meisten Carboxylgruppen von Proteinen ähnliche  $pK_a$ -Werte (vgl. auch A 1.3).

#### A 1.2.1.1.2 Lipidlösliche Toxine

Vertreter dieser Toxinklasse wurden aus einigen Pflanzenarten sowie aus tropischen Fröschen isoliert. Die bekannteren unter ihnen sind: Veratridin, Grayanotoxin und Aconitin; das sind Alkaloide aus verschiedenen Pflanzenarten, sowie Batrachotoxin, ein Alkaloid, das aus der Haut des kolumbianischen Frosches Phyllobates aurotaenia und verwandter Arten isoliert wurde.

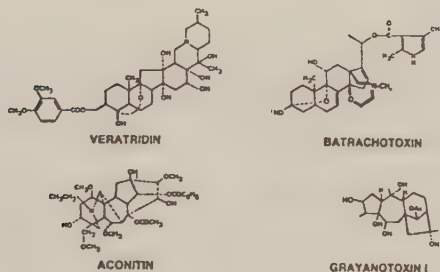


Abb. 4: Struktur der lipophilen Neurotoxine

Diese Toxine erhöhen die Ruheleitfähigkeit der erregbaren Membran (17) durch Einflußnahme auf den Aktivierungsprozeß der Natriumkanäle. Dieser wird in Gegenwart der Toxine schon bei negativeren Poten-

tialen eingeleitet als in Abwesenheit (18). Der resultierende Natriumstrom kann durch TTX blockiert werden.

Alle vier lipidlöslichen Toxine binden an eine gemeinsame Bindungsstelle, wie durch Ionenflußexperimente an Neuroblastomazellen nachgewiesen werden konnte (19, 20, s.a. 21).

Direkte Bindungsexperimente mit radioaktiv markierten Toxinen oder Toxinderivaten dieser Klasse erwiesen sich lange Zeit wegen des überwiegenden Anteils an unspezifischer Bindung dieser lipidlöslichen Toxine als unmöglich. Erst in neuerer Zeit konnte ein erfolgversprechendes Batrachotoxinderivat, Batrachotoxinin A 20- $\alpha$ -benzoat, radioaktiv markiert werden und im Bindungstest eingesetzt werden (21).

#### A 1.2.1.1.3 Peptidtoxine

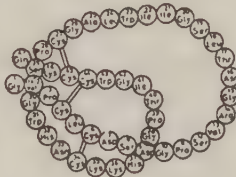
Diese neurotoxischen Polypeptide stammen aus dem Gift von Skorpionen und Seeanemonen (Abb. 5) und unterscheiden sich in ihrer Wirkung von den vorhergenannten.

Skorpiontoxine sind basische Polypeptide mit einem Molekulargewicht von etwa 7000. In ihrer Wirkung sind sie weniger selektiv als die oben beschriebenen Toxine. Sie besteht in einer Verlangsamung oder Blockierung der Natriumkanalinaktivierung (23 - 25). Außerdem verschieben Skorpiontoxine die Dosis-Wirkungskurve für die Aktivierung der Natriumkanäle durch die lipidlöslichen Toxine zu geringeren Konzentrationen (19, 20, 26). Skorpiontoxine wurden mit  $^{125}\text{Jod}$  radioaktiv markiert. Sie binden mit Dissoziationskonstanten von 0,5 - 15 nM (5) an verschiedene erregbare Membranen.

Diese Bindung wird in kooperativer Weise durch die lipidlöslichen Toxine erhöht und ist potentialabhängig, d.h. sie wird durch Depolarisation inhibiert (27, 28). TTX und Saxitonin beeinflusst die Bindung nicht (27, 28). In neuerer Zeit wurde ein Skorpiontoxin beschrieben, das nicht die Inaktivierung des Kanals inhibiert, sondern diesen blockiert. Seine Bindungsstelle ist jedoch weder mit der für andere Skorpiontoxine, noch mit der für TTX oder die lipidlöslichen Neurotoxine identisch (29).

Abb. 5:

Perlenkettenmodell  
von ATX II



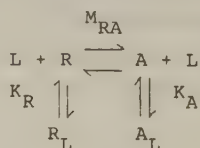
Seeanemonentoxine wurden in reiner Form zuerst aus der Wachsrose Anemonia sulcata isoliert (30, 31). Drei Toxine, ATX I bis III, wurden gereinigt und sequenziert (32-35). Auch aus anderen Seeanemonenarten, z.B. der Gattungen Anthopleura, Stoichactis, Actinodendron und Condylactis wurden bis heute zahlreiche Peptidtoxine isoliert (36), für die meisten Untersuchungen wurden jedoch ATX I-III verwendet. Auch diese Peptide sind stark basisch, ihr Molekulargewicht beträgt etwa 5000 (ATX I und II) bzw. 3000 (ATX III). ATX I und II besitzen große Sequenzhomologien, ATX III enthält sieben Aminosäurereste zwischen den Positionen 7 und 17, die zu denen zwischen Position 25 und 36

in den beiden anderen Toxinen homolog sind. Alle drei Toxine besitzen hydrophobe Bereiche.

ATX I, II und III verlängern in nanomolaren Konzentrationen Aktionspotentiale in Krebsnervenaxonen, wobei ATX I und II wirksamer sind als ATX III (37-39). ATX II im Gegensatz zu ATX I und III hat ähnliche Effekte auch am myelinisierten Froschnerv (39, 40). Wie TTX, muß auch ATX II sowohl bei Frosch- als auch Krebsnervenaxonen von außen appliziert werden, Perfusion des Axons zeigt keine Wirkung (39, 41). Ähnlich wie Skorpiontoxine, mit denen es eine gemeinsame Bindungsstelle teilt (42), verstärkt auch ATX II den Effekt der lipidlöslichen Toxine (42, 43). Dieses kooperative Verhalten wird durch Depolarisierung inhibiert, jedoch nicht so stark wie bei Skorpiontoxin (42).

ATX I und II sind mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert worden; S. Stengelin entwickelte in unserem Labor eine alternative Markierungsmethode für ATX II (43, 44). Ihre Bindung ist etwas weniger affin als die der Skorpiontoxine, die Dissoziationskonstanten liegen jedoch immer noch im nanomolaren Bereich (43, 45).

Aus den bisher aufgeführten mit Hilfe der Neurotoxine erhaltenen Ergebnissen entwickelte Catterall ein Natriumkanalmodell (19, 20), das sich an das von Monod, Wyman und Changeux erstellte allosterische Modell für Enzyme (46) anlehnt:



- Hiernach existiert der Natriumkanal in (mindestens) zwei Zuständen: einem aktiven (A) und einem inaktiven (R).
- Zwischen ihnen besteht ein Gleichgewicht, charakterisiert durch die sogenannte allosterische Konstante  $M_{RA}$ .
- Depolarisierung verändert vorübergehend  $M_{RT}$  und verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des aktiven Zustands.
- Interaktion mit den lipidlöslichen Toxinen ("L" im Modell) verschiebt das Gleichgewicht dauernd ebenfalls in Richtung auf den aktiven Zustand, da ihre Bindung an diesen höher affin ist als die an den inaktiven und sie den ersteren so aus dem Gleichgewicht entziehen. Die Bindung von L wird charakterisiert durch die Konstanten  $K_R$  und  $K_A$ .
- Die heterotrope allosterische Kooperation von Skorpiontoxinen mit den lipidlöslichen Toxinen wird erklärt durch eine Erniedrigung von  $M_{RA}$ , d.h. die freie Energie des Übergangs wird vermindert.

#### A 1.2.1.2 Molekulare Eigenschaften des Natriumkanals

Schon längere Zeit ist bekannt, daß Proteinmoleküle zumindest einen Teil des Kanals ausmachen. So konnte der Inaktivierungsmechanismus durch Perfusion des Axons mit Pronase zerstört werden (47) und der Ionenstrom durch den Kanal wurde blockiert durch Reagenzien, die spezifisch für funktionelle Gruppen von Proteinen sind (48).

Weitere Auskünfte über diese Proteinmoleküle können durch die Anwendung verschiedener Forschungsstrategien erhalten werden:

- Identifikation der Bestandteile des Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismus durch kovalente

Reaktion mit den für sie spezifischen radioaktiv markierten Toxinen.

- Solubilisierung und Reinigung des gesamten Natriumkanalkomplexes und Bestimmung seiner physikalischen molekularen Eigenschaften.
- Rekonstitution des solubilisierten Natriumkanalkomplexes in künstliche Lipidsysteme mit dem Ziel, durch gezielte Veränderung verschiedener Parameter genauere Auskünfte über seine Funktion zu erhalten.

Alle diese Strategien wurden angewandt, die Ergebnisse sind allerdings zum Teil widersprüchlich.

Kovalent markiert wurden bisher nur die Bindungsstellen für Polypeptidtoxine. Einige Experimente hierzu sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

| Material                | Toxin         | Bindungsstelle(n)<br>( $M_r$ ) | Literatur |
|-------------------------|---------------|--------------------------------|-----------|
| Krebsnerven             | ATX I         | 53 000                         | 43, 45    |
| Rattenhirn-synaptosomen | Skorpiontoxin | 250 000<br>32 000              | 49        |
| Neuroblastoma-zellen    | Skorpiontoxin | 250 000                        | 49, 50    |
| Krabbennerven           | Skorpiontoxin | 76 000<br>56 000               | 51        |
| Rattenhirn-synaptosomen | Skorpiontoxin | 270 000<br>38 000              | 52        |

Tab. 1: Molekulargewicht kovalent markierter Proteinuntereinheiten im SDS-Polyacrylamidgel

Die in den Literaturstellen (49, 50, 52) beschriebenen hoch- bzw. niedermolekularen Bindungsstellen wurden von den Autoren als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bezeichnet. Sie scheinen auch die Saxitoxinbindungsstelle einzuschließen (52).

Zahlreicher sind die Versuche, den Natriumkanal zu solubilisieren und zu reinigen, als Kriterium der Reinigung wird hierbei die spezifische Bindung von TTX oder Saxitoxin verwendet. Schon vor zehn Jahren wurde diese Bindungsstelle aus dem Riechnerv des Hornhechtes solubilisiert (53, 54). Essentiell war hier die Anwendung eines nichtionischen Detergens, dennoch erwiesen sich diese Präparationen als sehr instabil. Durch die Anwesenheit von exogenem Lipid (Phosphatidylcholin) (55, 56), von Lipid und  $\text{Ca}^{2+}$  (57), sowie von Lipid,  $\text{Ca}^{2+}$  und speziellen Proteasehemmstoffen (52) konnte dieses Problem überwunden werden.

Bisher wurde das TTX- bzw. Saxitoxinbindungsprotein aus Elektroplaques (55, 56), Rattenmuskelsarkolemma (58, 59), Kalbshirn (60) und Rattenhirn (52, 61) gereinigt.

Räumliche Ausdehnung sowie das Molekulargewicht des solubilisierten toxinbindenden Komplexes (alle Autoren gehen von der stillschweigenden oder auch ausgesprochenen Annahme aus, daß es sich dabei um den solubilisierten Natriumkanalkomplex handelt) wurde in einigen Fällen durch Gelfiltration, Sedimentationsanalyse und Gелеlektrophorese bestimmt (Tab. 2).

| Material                                    | Rattenhirn-<br>sarkolemma                                    | Kalbshirn-<br>synapto-<br>somen                               | Rattenhirn-<br>synapto-<br>somen | Electro-<br>phorus<br>Elektro-<br>plaques |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
| Detergens                                   | NP-40                                                        | Cholat                                                        | Triton X-100                     | Lubrol-PX                                 |
| Stokes<br>Radius ( $\text{\AA}$ )           | 86                                                           | 120                                                           | 80                               | 95                                        |
| Sedimenta-<br>tionskoeff.<br>$S_{20,w}$ (S) | 9,1 ( $\text{H}_2\text{O}$ )<br>6,1 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) | 11,8 ( $\text{H}_2\text{O}$ )<br>7,1 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) | 11,3 ( $\text{H}_2\text{O}$ )    | 8,0 ( $\text{H}_2\text{O}$ )              |
| $M_r$ des<br>Gesamt-<br>Komplexes           | 560 000                                                      | 1 020 000                                                     | 601 000                          | nicht best.                               |
| $M_r$ des<br>Protein-<br>anteils            | 314 000                                                      | $\leq$ 560 000                                                | 316 000                          | nicht best.                               |
| Literatur                                   | 59, 58                                                       | 60                                                            | 52, 61                           | 55                                        |

Tab. 2: Einige Eigenschaften des solubilisierten  
Natriumkanalkomplexes

Versuche zur Rekonstitution von Natriumkanalkomponenten in künstliche Lipidsysteme wurden zuerst von Villegas und Mitarbeitern unternommen (62). Sie erhielten mit einer Gefrier-Tau-Ultraschall-Prozedur "erregbare" Liposomen ( $^{22}\text{Na}^+$ -Fluß konnte durch lipidlösliche Toxine aktiviert, durch TTX blockiert werden), eine Solubilisierung des Natriumkanalkomplexes vor der Rekonstitution wurde jedoch in diesem Experiment nicht vorgenommen.

Goldin und Mitarbeiter (60) berichteten über die Inkorporation von Cholat-solubilisiertem Material aus Kalbshirn in Phospholipidvesikel.  $\text{Cs}^+$ -Efflux aus diesen Vesikeln wurde durch Veratridin stimuliert. Erst Catterall und Mitarbeiter zeigten funktionelle Rekonstitution aller drei Toxinbindungsaktivitäten nach Solubilisierung des Natriumkanals aus Rattenhirnsynaptosomen (63, 64); Weigele und Barchi konnten mit ähnlichem Erfolg Rekonstitution eines Präparates aus Rattenmuskel durchführen (65).

#### A 1.2.2 Der Acetylcholinrezeptor-Komplex der postsynaptischen Membran

Pharmakologen unterscheiden zwei Typen des Acetylcholinrezeptors (AChR):

- den muskarinischen AChR, er kommt vor allem im vegetativen Nervensystem vor, wird durch Muskarin stimuliert und durch Atropin blockiert;
- den nikotinischen AChR, der vor allem im Skelettmuskel gefunden wird. Nikotin wirkt hier stimulierend, Curare hemmend.

Im Folgenden wird von einem nikotinischen AChR die Rede sein.

##### A 1.2.2.1 Untersuchungen am AChR in vivo

Daß die biochemische Forschung am AChR viel weiter fortgeschritten ist als am spannungsabhängigen Natriumkanal, verdankt die Wissenschaft den elektrischen Fischen Zitteraal (Electrophorus electricus) und Zitterrochen (Torpedo spec.). Deren elektrisches Organ ist phylogenetisch nichts anderes als Muskelgewebe, dessen kontraktile Apparat zurückgebildet ist.

Neuromuskuläre Endplatten mit den darin verankerten Rezeptormolekülen sind jedoch in großer Zahl vorhanden. Diese Tatsache erlaubte vor gut zehn Jahren die Solubilisierung und Isolierung des AChR in nicht-denaturierenden Detergentien (66, 67); heute lassen sich ohne allzu großen Aufwand Dezigrammengen Rezeptorprotein in vitro herstellen.

Zunächst jedoch ergab die Anwendung pharmakologischer und elektrophysiologischer Methoden wertvolle Erkenntnisse.

Das elektrische Organ der erwähnten Fische besteht aus einzelnen Zellen, den Electroplaques. Ihre Schaltung in Reihe und Serie befähigt den Fisch, sie koordiniert zu depolarisieren, was zu elektrischen Entladungen von beträchtlicher Stärke führt.

1957 gelang es Schöffeniels und Nachmansohn, einzelne Electroplaques aus E. electricus zu isolieren und elektrophysiologisch zu untersuchen (68). Die entsprechenden Methoden für Torpedo-Electroplaques wurden erst zwei Jahrzehnte später entwickelt (69). Die mit diesen und anderen Präparaten (z.B. Froschmuskeln) erzielten Ergebnisse sind im weiteren beschrieben.

Pharmakologische Untersuchungen am Electroplaque zeigten schon sehr bald, daß nicht nur Acetylcholin von dem Rezeptor gebunden wird, sondern noch andere Substanzen. Einige davon, wie Decamethonium, Carbamylcholin, Phenyltrimethylammonium u.a. bewirken ebenfalls Depolarisierung der postsynaptischen Membran. Sie werden deshalb als Agonisten bezeichnet. Andere wie z.B. d-Tubocurarin, Gallamin, Hexamethonium und verschiedene Schlangengifte ( $\alpha$ -Toxine) blockieren den Agonisteneffekt, sie wirken also inhibitorisch und werden (kompetitive) Antagonisten genannt.

Die Depolarisierung z.B. der neuromuskulären Endplatte des Froschmuskels wird durch lang anhaltende Applikation von Agonisten nicht nur nicht aufrechterhalten, sondern nimmt sogar ab (70). Diese Änderung der Eigenschaften während lang andauernder Agonisteneinwirkung wird als Desensitivierung bezeichnet. Die Desensitivierung kann Sekunden dauern, wenn der Agonist iontophoretisch auf die Endplatte gebracht wird (70), oder Minuten, wenn er einfach in die Badlösung gegeben wird (71).

Außer Agonisten und kompetitiven Antagonisten gibt es noch eine dritte Klasse von Effektoren: Lokalanästhetika oder nicht kompetitive Antagonisten. Sie beschleunigen in vivo und in vitro (s.u.) die Desensitivierung (72, 73). Hierzu gehören Pharmaka wie Lidocain und Procain.

Ein Rezeptorfunktionsmodell, das den beschriebenen Verhältnissen Rechnung trägt, wurde 1957 von Katz und Thesleff entwickelt (70). Hierin könnte der Rezeptor drei Konformationen einnehmen: eine im Ruhezustand (R-Form), eine andere in der aktivierten Form (A-Form), die durch die Bindung eines Agonisten erreicht wird und eine dritte in der desensitivierten Form (D-Form), in der der Ionenkanal blockiert ist, der Rezeptor aber dennoch und sogar mit höherer Affinität Agonisten bindet. Inzwischen um mindestens einen (Intermediär-) Zustand erweitert (I-Form) (74), findet dieses Modell ähnlich wie das oben erwähnte Catterall'sche für den Natriumkanal seine theoretischen Grundlagen in den Vorstellungen von Monod, Wyman und Changeux über allosterische Regulation (46).

Abb. 6:

Formen des AChR-Komplexes  
im Gleichgewicht. Aus (74).  
Erklärung im Text.



#### A 1.2.2.2 Molekulare Eigenschaften des AChR

Die Bindung cholinergischer Liganden erwies sich als kein guter Parameter für die Dokumentation der Isolierung und Reinigung von Rezeptormolekülen aus den elektrischen Organen der schon erwähnten Fische. Dies deshalb, da diese Liganden nicht nur mit dem Rezeptor interagieren, sondern auch an andere Strukturen der neuromuskulären Synapse binden, wie z.B. die Acetylcholinesterase oder den Cholin-Wiederaufnahmemechanismus der präsynaptischen Membran.

Abhilfe schuf die Entdeckung, daß bestimmte Polypeptidtoxine ( $\alpha$ -Toxine) aus Schlangengift spezifisch und mit hoher Affinität an den Rezeptor und nur an ihn binden (66). Über die Bindung dieser (radioaktiv markierten) Toxine konnte hinfort Isolierung und Reinigung des AChR verfolgt werden.

Durch nichtdenaturierende Detergentien wie Natriumdeoxycholat (66) oder Triton X 100 (67) wurde der AChR unter Erhalt der Toxinbindungsaktivität solubilisiert. Der Komplex sedimentiert in zwei Formen mit Sedimentationskoeffizienten von 9 S und 13 S (75). Die 13 S-Form ist ein Dimer der leichteren 9 S-Form; in Gegenwart von Reduktionsmitteln tritt nur noch die 9 S-Form auf.

Parallel zur Solubilisierung des AChR wurde versucht, rezeptorhaltige Membranfragmente zu isolieren. Im Saccharosegradienten konnten zunächst Acetylcholinesterase-Aktivität und AChR-Bindungsaktivität getrennt werden (76, 77), nach weiterer Verfeinerung der Präparationsmethoden (78) besteht schließlich bei der in unserem Labor verwendeten Methode (79) über 80 % der Gesamtmenge des Proteins in den gereinigten Membranfragmenten aus Rezeptorprotein.

Die Präparation rezeptorreicher Membranfragmente gewährleistet im Gegensatz zur Solubilisierung ein Verbleiben des AChR in seiner natürlichen Lipidumgebung und damit weitgehende Erhaltung seiner funktionellen Eigenschaften; trotz der sogenannten "nicht-denaturierenden" Detergentien sind nämlich z.B. Bindungseigenschaften des solubilisierten Rezeptors teilweise irreversibel verändert (80).

Zudem konnte mit diesen Membranfragmenten eine weitere Funktion des AChR in vitro untersucht werden: der mit dem Agonisten-bindenden Protein gekoppelte Ionenkanal. Die Fragmente formen in der Präparation geschlossene Vesikel, auch "microsacs" genannt. Kasai und Changeux entwickelten nun eine Technik (81), bei der die Vesikel mit radioaktiven Natriumionen equilibriert werden. Nach Verdünnung der Vesikel in nichtradioaktivem Medium kann der Ausfluß ("Efflux") von Natriumionen mittels einfacher Filtrationstechniken verfolgt werden; er erwies sich als stimulierbar durch den cholinergen Agonisten Carbamylcholin. Eine Vielzahl

von Untersuchungen sind seitdem mit diesem System durchgeführt worden (74).

Die Zusammensetzung des AChR-Proteinkomplexes war einige Zeit Gegenstand heftiger Kontroversen (74, 82). Viel Verwirrung stiftete hierbei wohl die unkontrollierte Aktivität von Proteasen in den Präparationen. Ein Molekulargewicht für den Gesamtkomplex von ca. 270 000  $\pm$  30 000, wie schon von Biesecker bestimmt (83), wird heute allgemein als zutreffend akzeptiert (74, 82). Der Komplex setzt sich zusammen aus vier verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die mit denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt werden können und Molekulargewichte von ca. 40 000, 48 000, 60 000 und 68 000 aufweisen (84).

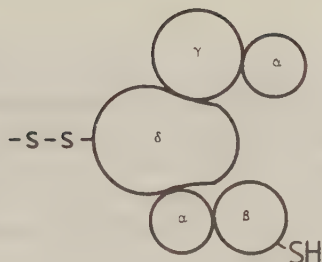
Diese vier Untereinheiten bilden zusammen eine pentamere Struktur; die Stöchiometrie  $\alpha_2\beta\gamma\delta$ , von Reynolds und Karlin erstmals vorgeschlagen (158), gilt jetzt ebenfalls als gesichert (74, 82).

Der AChR-Komplex besitzt jeweils zwei Bindungsstellen für cholinerge Agonisten und  $\alpha$ -Toxine (74, 82).

Die Untersuchung des Komplexes mit spaltbaren bifunktionellen Reagenzien ("crosslinker") ermöglichte durch die Bestimmung von Nachbarschaften die Erstellung eines AChR-Modells (Abb. 7).

Abb. 7:

Strukturmodell des  
AChR. Aus (82).



Zur Funktion der einzelnen Untereinheiten existieren wenig gesicherte Erkenntnisse.

Die cholinerge Bindungsstelle ist sicherlich auf der  $\alpha$ -Untereinheit lokalisiert: dies beweisen Versuche mit cholinergen Affinitätsreagenzien (84, 85), alkylierenden Agonistenderivaten (86), sowie photoaktivierbaren Derivaten des antagonistischen Schlangengiftes  $\alpha$ -Bungarotoxin (87, 88).

Die Rolle der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten erscheint gegenwärtig noch völlig unklar (74, 82).

Zwei  $\delta$ -Untereinheiten formen im Rezeptor-Dimer (s.o.) eine Disulfidbrücke (89); darüber hinaus kann sie u.a. mit radioaktiven Lokalanästhetika markiert werden (90, 91), was ihr möglicherweise eine Rolle bei der Ionenkanalfunktion zuweist (s.u.).

Ist auch die Funktion der Untereinheiten im Einzelnen noch weitgehend unbestimmt, so zeigen doch Rekonstitutionsexperimente, daß alle zusammen für sämtliche Rezeptorfunktionen ausreichend sind: Integration

des gereinigten Rezeptorkomplexes bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten in künstliche vesikuläre (92) oder planare (93) Lipidmembranen ergab funktionell völlig intakte erregbare Systeme.

#### A 1.2.2.3 Lokalanästhetika und der Ionenkanal des AChR-Komplexes

Im Vergleich mit der des spannungsabhängig regulierten Natriumkanals ist die Selektivität dieses Ionenkanals nicht sehr hoch. Die Bindung von Agonisten an den Rezeptor bewirkt in vivo (94) und in vitro (81) eine Erhöhung der Permeabilität nicht nur für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , sondern auch für andere Alkaliionen, auch für  $\text{Ca}^{2+}$  sowie für verschiedene organische Kationen. Der Durchmesser des Kanals wurde mit 0,6 nm bis 0,8 nm abgeschätzt (82). Anionen wie  $\text{Cl}^-$  können den Kanal nicht passieren.

Neher und Steinbach konnten mit der "patch-clamp"-Methode das Öffnen und Schließen von Einzelkanälen verfolgen (95); sie fanden für den Acetylcholin-aktivierten Einzelkanal eine Öffnungszeit von 1 msec bis 3 msec bei einer Leitfähigkeit von 15 pS bis 30 pS. Diese Werte waren schon früher näherungsweise aus der Analyse von Spannungsfluktuationen der postsynaptischen Membran ermittelt worden (96) und wurden auch für den in planare Lipidmembranen rekonstituierten AChR-Komplex gefunden (93). Die Öffnungszeit des Kanals ist abhängig sowohl von der Art des Agonisten als auch vom Membranpotential: Depolarisierung verkürzt die Lebensdauer.

Wichtige Reagenzien für die Erforschung der Kanalfunktion sind die oben schon erwähnten Lokalanästhetika, die auch als nonkompetitive Inhibitoren bezeichnet

werden (74). Sie sind allosterische Effektoren am AChR, d.h. sie blockieren im Gegensatz zu den kompetitiven Antagonisten nicht die Bindung von Agonisten (73), inhibieren aber dennoch teilweise oder vollständig die Permeabilitätserhöhung.

Während ihre Wirkung früher hauptsächlich in der Beschleunigung der Desensitivierung gesehen wurde (73), existieren heute auch Hinweise für eine direkte Interaktion von Lokalanästhetika mit dem geöffneten Kanal in der aktiven Form des AChR: bei Einzelkanalmessungen wurde beobachtet, daß die Viereckpulse des geöffneten Kanals in Gegenwart des Lidocainderivates QX-222 in Einzelereignisse von viel kürzerer Dauer "zerhackt" wurden (95); die einfachste Erklärung hierfür ist das wiederholte Binden von Lokalanästhetikamolekülen an den offenen Kanal, der hierdurch blockiert wird.

Drei Klassen von Lokalanästhetika können unterschieden werden (74, 97):

- Lokalanästhetika, die Endplattenpotentiale bei negativeren Potentialen effektiver blockieren. Hierzu gehören z.B. Procain, Lidocain, Tetracain und Trimethisoquin.
- Lokalanästhetika, deren Wirkung durch Depolarisierung verstärkt wird wie das kolumbianische Froschgift Histronicotoxin sowie das Halluzinogen Phencyclidin.
- Lokalanästhetika, die spannungsunabhängig blockieren, z.B. Dibucain, Chlorpromazin und Benzocain.

Zur letzten Klasse gehören auch allgemeine Anästhetika, Alkohole sowie verschiedene Detergentien wie Triton X 100, Lubrol PX, Natriumdeoxycholat, die in Konzentrationen

unterhalb ihrer cmc ("critical micelle concentration") Lokalanästhetika-ähnliche Effekte bewirken können. Eine andere Unterscheidungsmöglichkeit ergibt sich aus unterschiedlicher pharmakologischer Spezifität der Lokalanästhetika (98), da offensichtlich mindestens zwei Arten von Bindungsstellen existieren: Perhydrohistrionicotoxin-sensitive und Perhydrohistrionicotoxin-insensitive (Perhydrohistrionicotoxin ist ein Derivat des Histrionicotoxins und diesem in der Wirkung ähnlich). Mit der ersten Klasse von Bindungsstellen interagieren z.B. Proadifen, Meproadifen, Dibucain sowie die Detergentien Triton X 100, Nonidet P 40; die Perhydrohistrionicotoxin-insensitiven Bindungsstellen dagegen werden besetzt von Di- und Trimethisoquin, Lidocain, Prilocain, Chlorpromazin sowie dem Detergens Lubrol PX (98).

Die funktionelle Bedeutung sowohl der verschiedenen Arten von Bindungsstellen als auch der unterschiedlichen Potentialabhängigkeit ist nicht ohne weiteres ersichtlich.

Generell läßt sich die Wirkung von Lokalanästhetika folgendermaßen beschreiben:

- Sie beschleunigen in Gegenwart von Agonisten die Desensitivierung. Dies läßt sich im allosterischen Modell des AchR durch ihre bevorzugte Bindung an die D-Form des Rezeptors erklären, die so aus dem Gleichgewicht entzogen wird.
- In Abwesenheit von Agonisten wird ebenfalls die D-Form stabilisiert (99), die auch ohne Agonist zu ca. 20 % vorliegt (74).
- Umgekehrt stimulieren Agonisten und einige Antagonisten die Bindung von Lokalanästhetika. Dies wurde in direkten Bindungsstudien mit radioaktiven

Derivaten von Trimethisoquin (100), Meproadifen (101), Histrionicotoxin (102, 103) und Phencyclidin (104) gezeigt, wobei sich die Stimulierung durch Agonisten noch mit dem bis hier beschriebenen Modell in Einklang bringen läßt, während sich die stimulierende Wirkung z.B. des Antagonisten d-Tubocurarin nicht mehr ohne weiteres erklären läßt (s.a. Diskussion in B 2.2.6).

Histrionicotoxin und auch Phencyclidin unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten übrigens von anderen Lokalanästhetika: signifikante Bindung wird auch in Abwesenheit von cholinergen Liganden gemessen; dies wird erklärt durch Bindung nicht nur an die D-Form, sondern auch an die R-Form des Rezeptors.

Obwohl allgemein akzeptiert ist, daß Lokalanästhetika direkt oder indirekt mit dem Ionenkanal interagieren (74), so ist doch eine Interpretation der mit ihnen erhaltenen Ergebnisse stets mit Vorsicht vorzunehmen. So wurde ein in rezeptorreichen Membranfragmenten gefundenes Peptid mit dem Molekulargewicht 43 000 (auch als  $\omega$  bezeichnet) vorschnell als Ionophor oder Ionenkanal identifiziert, da es mit dem Lokalanästhetikum Quinacrin interagierte (105), spätere Versuche zeigten jedoch, daß es gar nicht zum AChR-Komplex gehört und ohne Verlust irgendeiner Rezeptorfunktion aus der Membran extrahierbar ist (106).

Als ein Bindungsort einiger Lokalanästhetika wurde auch die  $\delta$ -Untereinheit identifiziert. Dies geschah mit Hilfe eines Azido-Derivates von radioaktivem Trimethisoquin (90) sowie durch Markierung mit radioaktivem Phencyclidin und Histrionicotoxin mittels UV-Bestrahlung (91). Es kann hieraus natürlich nicht geschlossen

werden, daß (allein) die  $\delta$ -Untereinheit den Ionenkanal ausmacht; ein anderes Experiment macht jedoch zumindest wahrscheinlich, daß Ionenkanal und cholinerge Bindungsstelle auf verschiedenen Untereinheiten lokalisiert sind: der Ionophor des AChR-Komplexes wird durch ein alkylierendes Derivat des Lokalanästhetikums Quinacrin dauernd blockiert (107). AChR mit blockiertem Ionenkanal sowie AChR mit durch  $\alpha$ -Bungarotoxin irreversibel blockierter cholinerges Bindungsstelle hybridisierten nach Solubilisierung in Triton X 100 und bildeten nach Rekonstitution in Membranvesikel funktionelle Rezeptorkomplexe (108).

#### A 1.3 Einige Bemerkungen zu Ionenkanälen

Eine Lipiddoppelschicht, die Grundstruktur der biologischen Membran, ist normalerweise für Ionen wie  $\text{Na}^+$  völlig undurchlässig. Grund dafür ist das elektrostatische Potential auf der Oberfläche des Ions. In einem polaren Lösungsmittel umgeben mobile Moleküle mit permanentem oder induziertem Dipolmoment das Ion. Durch die Orientierung der negativen Enden des Dipols hin zum Ion (im Fall eines Kations) wird das elektrostatische Potential verringert; in Wasser ist ein Ion deshalb von einer Hydrathülle umgeben. Um aus der wässrigen Phase mit ihrer hohen Dielektrizitätskonstante in die Lipidphase mit wenig Dipolen und kleiner Dielektrizitätskonstante übertreten zu können, muß z.B. ein  $\text{Na}^+$ -Ion eine Energiebarriere von mehreren hundert kJ/Mol überwinden. Bei normalen Temperaturen ist die Wahrscheinlichkeit eines solchen Überganges praktisch null (109).

Ein Ionenkanal muß also prinzipiell imstande sein, diese Energiebarriere zu verkleinern; dies könnte z.B. durch die "Auskleidung" des Kanallumens mit polaren oder geladenen Gruppen erreicht werden. Ein (Natrium-)kanalfunktionsmodell, das auf diesen Vorstellungen aufbaut, wurde von Hille vorgeschlagen (110): das Ion bindet zunächst an eine geladene Gruppe, möglicherweise eine Carboxylatgruppe, an oder in der Öffnung des Kanals und durchtritt den Kanal in einem teilweise dehydratisierten Zustand, um dann an der anderen Seite der Membran wieder hydratisiert zu werden und von der Kanalöffnung abzu dissoziieren. Aus dem oben gesagten wird klar, daß die Dehydratisierung die Energiebarriere darstellt, die durch das elektrochemische Potential des Ions überwunden werden muß.

Es scheint so, als ob Ionenkanäle ganz allgemein, egal ob chemisch oder spannungsabhängig reguliert, diese gemeinsamen Grundstrukturen aufweisen. So wurde die Beteiligung einer geladenen Gruppe, wahrscheinlich einer Carboxylatgruppe, am ersten Schritt der Kanalfunktion nicht nur beim spannungsabhängigen Natriumkanal, sondern auch für den AChR-gekoppelten Ionenkanal sowie für verschiedene Calciumkanäle nachgewiesen (z.B. 111 - 113).

A 2

## Problemstellung

Zwei funktionelle Einheiten der Nervenimpulsübertragung, der spannungsabhängige Natriumkanal und der nikotinische Acetylcholinrezeptor, sollten biochemisch näher untersucht werden.

### I Natriumkanal

In unserem Labor wurde die Bindung des radioaktiv markierten Seeanemonentoxins ATX I an ganze Krebsnerven gemessen (43, 45, 114). Diese Untersuchungen sollten fortgeführt und ergänzt werden. Darüberhinaus sollte eine Präparation subzellulärer axonaler Membranfragmente vorgenommen und deren Bindungsverhalten ebenfalls charakterisiert werden.

Durch kovalenten Einbau von ATX I sollten schließlich diejenigen Komponenten des Kanalkomplexes identifiziert werden, die für die Inaktivierung des Kanals verantwortlich sind.

### II Acetylcholinrezeptor

Die spezifische Bindungsstelle des Acetylcholinrezeptorkomplexes für das lipophile Kation Methyltriphenylphosphonium sollte charakterisiert werden.

B EIGENE EXPERIMENTE

B 1 Untersuchungen am Natriumkanal

B 1.1 Radioaktive Markierung von ATX I

Als Methode der Wahl bot sich die Markierung durch  $^{125}\text{I}$  mittels der Lactoperoxidase-Reaktion an (115). Lactoperoxidase katalysiert auf schonende Weise die Iodierung vor allem von Tyrosinresten in Gegenwart von Iodid und einem Oxidationsmittel (Wasserstoffperoxid). Hierbei können Monoiodtyrosin-, in Gegenwart eines Überschusses an Iodid jedoch auch Diiodtyrosinderivate entstehen. ATX I besitzt einen Tyrosinrest und kann deshalb auf diese Weise markiert werden. Das Diiodderivat von ATX I ist deutlich weniger toxisch als das native Toxin (43), während die Toxizität des Monoiodderivates vergleichsweise kaum verändert erscheint (43, 45, 114). Für die Iodierung wurden deshalb Bedingungen gewählt, bei denen nur das Monoiodderivat entsteht (43) (s. C 2.1). Hierzu wurden 4 nMol Toxin mit 0,25 nMol bis 1 nMol  $^{125}\text{I}$  (je nach spezifischer Radioaktivität der verwendeten Iodcharge) umgesetzt. Diese Bedingungen führten in der Regel zu fast vollständigem Einbau des eingesetzten  $^{125}\text{I}$ .

Ein Problem ergab sich bei der Konzentrationsbestimmung des iodierten ATX I. ATX I adsorbiert wie viele andere kleine basische Peptide unspezifisch an Oberflächen. Um unnötige Verluste an Toxin zu

vermeiden, wurde deshalb die zur Trennung des iodierten Toxins von freiem Iodid verwendete Säule mit 1 mg/ml Gelatine equilibriert (s. C 2.1). Gelatine befand sich also immer in großem Überschuß zu ATX I (4 nMol entsprechen 20 µg), deshalb konnten die üblichen Methoden der Konzentrationsbestimmung (Absorptionsmessungen, Proteinbestimmungen) nicht durchgeführt werden. Um dennoch Aussagen über Konzentration und spezifische Radioaktivität von  $^{125}\text{I}$ -ATX I machen zu können, wurde auf eine rechnerische Methode zurückgegriffen. Folgendes Beispiel mag sie verdeutlichen.

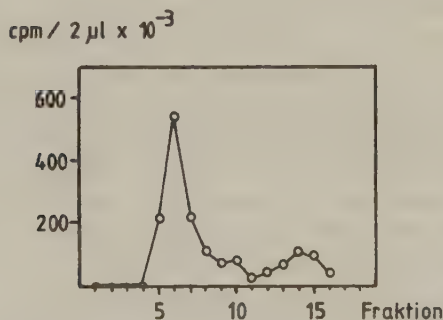


Abb. 8: Verteilung der Radioaktivität im Eluat einer Sephadex G 10 Säule; Trennung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I und  $^{125}\text{I}$ . S. C 2.1. Es wurden 0,5 ml-Fractionen gesammelt; die angegebenen cpm-Zahlen beziehen sich auf 2 µl.

In diesem Versuch wurden insgesamt 480 µCi  $^{125}\text{I}$ , d.h. ca.  $10^9$  dpm eingesetzt. Dies sind bei einer

Zählausbeute von 45 % 450 Mio. cpm.

Aus der Säule wurden im Einzelnen folgende cpm-Werte eluiert (Tab. 4):

| Fraktionsnummer | cpm/2 µl in Tsd. | cpm/Fraktion in Mio. |
|-----------------|------------------|----------------------|
| 5               | 210              | 52,50                |
| 6               | 540              | 135,00               |
| 7               | 215              | 53,75                |
| 8               | 100              | 25,00                |
| 9               | 65               | 16,25                |
| 10              | 75               | 18,75                |
| 11              | 20               | 5,00                 |
| 12              | 35               | 8,75                 |
| 13              | 60               | 15,00                |
| 14              | 100              | 25,00                |
| 15              | 90               | 22,50                |
| 16              | 35               | 8,75                 |

Tab. 4: Verteilung der Radioaktivität im Säuleneluat aus Abb. 8.

Insgesamt werden also 386,25 Mio. cpm, d.h. ca. 85 % der eingesetzten 450,00 Mio. cpm in den Säulenfraktionen wiedergefunden.

<sup>125</sup>Iodid wird an Sephadex G 10, das verwendete Säulenmaterial, praktisch überhaupt nicht adsorbiert, so daß der Verlust an cpm durch zurückgehaltenes <sup>125</sup>I-ATX I zustandekommt. Da nicht anzunehmen ist, daß sich <sup>125</sup>I-ATX I und natives ATX I in ihrem Adsorptionsverhalten merklich unterscheiden,

gingen in der Gelchromatographie in diesem Fall also 15 % der eingesetzten 4 nMol Toxin verloren.

Das eluierte Toxin (3,4 nMol) findet sich wieder v.a. in den Fraktionen 5 bis 8 mit insgesamt 266,25 Mio. cpm, davon 50 % in Fraktion 6 mit 135,00 Mio. cpm.

Die Konzentration an Toxin in Fraktion 6 ist also 1,7 nMol/0,5 ml, d.h. 3,4  $\mu$ M, die spezifische Radioaktivität ist 135 Mio. cpm/1,7 nMol, d.h. 80 Ci/mMol.

#### B 1.2 Untersuchungen am ganzen Nerven

Verwendet wurden hierzu die Hauptgehirnnerven aus den Scheren des Flußkrebsses Astacus leptodactylus. S. Stengelin konnte in unserem Labor zeigen, daß  $^{125}\text{I}$ -ATX I spezifisch und saturierbar an die axonale Membran gebunden wird (43, 114).

Die Bindungskapazität betrug ca. 40 fMol/mg Nerv (Naßgewicht), die Dissoziationskonstante  $K_D$  war 40 nM in Abwesenheit und 5 nM in Gegenwart des Kanalblockers TTX. Die Zahl der Bindungsstellen pro Flächeneinheit wurde zu 30  $\mu\text{m}^{-2}$  bestimmt.

Die unterschiedlich hohen Affinitäten in Gegenwart und Abwesenheit von TTX wurden mit einer Potentialabhängigkeit der ATX-Bindung erklärt. TTX verhindert die Depolarisierung der Axonmembran bei spontaner Öffnung des Natriumkanals und stabilisiert so das Membranpotential während der relativ langen Inkubationszeiten (s.u.).

Die Experimente an ganzen Nerven wurden deshalb in Gegenwart von TTX durchgeführt.

#### B 1.2.1 Bindungsversuche mit $^{125}\text{I}$ -ATX I

Die Equilibrierung von ganzen Nerven mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I nimmt mehrere Stunden in Anspruch (Abb. 9). Im Routineversuch wurde deshalb die Inkubation über Nacht vorgenommen (s. C 2.2).

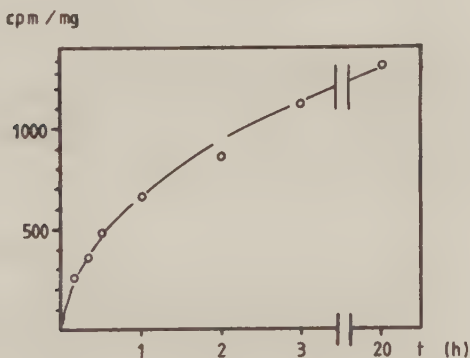


Abb. 9: Kinetik der Equilibrierung ganzer Krebsnerven mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I.  
[ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 80 nM. [TTX]: 50  $\mu\text{M}$ .

Ein Kriterium für die Signifikanz der Bindung eines radioaktiven Liganden an biologisches Material ist seine Verdrängbarkeit durch gleichartige unmarkierte Liganden. Diese Tatsache macht die Spezifität einer Bindung aus (vgl. C 2.4.1).

Abb. 10 zeigt, daß dieses Kriterium für  $^{125}\text{I}$ -ATX I erfüllt ist.

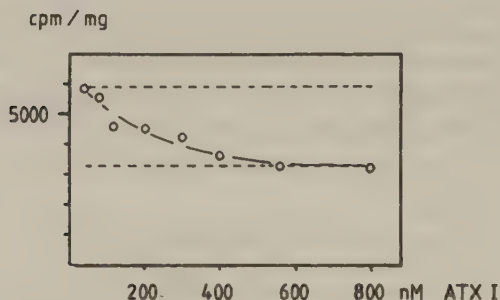


Abb. 10: Verdrängung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I durch natives ATX I.  
[ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 100 nm, [TTX]: 50  $\mu\text{M}$ .  
Der obere Balken gibt die Menge an gebundenem  $^{125}\text{I}$ -ATX I in Abwesenheit von ATX I an, der untere ebenfalls in Abwesenheit von ATX I, jedoch in Gegenwart von 3 mM  $\text{NaN}_3$  ohne TTX.

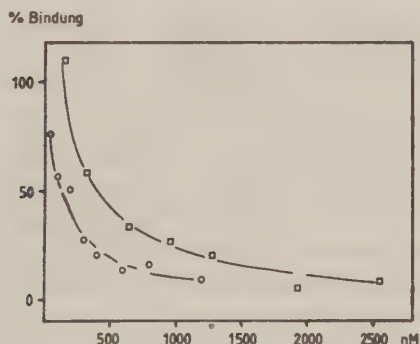
Ca. 50 % der Gesamtmenge an gebundenem  $^{125}\text{I}$ -ATX I lassen sich also auch durch einen bis zu zehnfachen Überschuß an nativem ATX I nicht verdrängen; dieser Anteil wird unspezifisch gebunden z.B. durch Adsorption an Nervengewebe.

Eine weitere Eigenschaft der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung kann ebenfalls aus Abb. 10 entnommen werden: in Gegenwart von Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) wird nur noch unspezifische Bindung beobachtet, eine Tatsache, die mit der Poten-

tialabhängigkeit der (spezifischen) Bindung erklärbar ist (43, 114). Natriumazid als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung verhindert die Bildung von Adenosintriphosphat, die Na/K-abhängige ATPase kann also den passiven Leckstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen während der langen Inkubationszeit nicht mehr ausgleichen (s. A 1.2) und die Axonmembran depolarisiert.

#### B 1.2.2 ATX II und ATX III als Inhibitoren der $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung

ATX II und III verlängern wie ATX I Aktionspotentiale in Krebsnervenaxonen (s. A 1.2.1.1.3). Es erschien daher von Interesse, inwiefern ihre Bindung die von  $^{125}\text{I}$ -ATX I inhibiert. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse von Kompetitionsversuchen mit ATX II und III.



**Abb. 11:** Verdrängung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I durch ATX II (-o-) und ATX III (-□-).  
 $[^{125}\text{I}\text{-ATX I}]$ : 80 nM.  $[\text{TTX}]$ : 50  $\mu\text{M}$ .  
 100 % bedeutet Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I in Abwesenheit von ATX II und III, 0 % ist Bindung ebenfalls in Abwesenheit von ATX II und III, jedoch in Gegenwart von 3 mM  $\text{NaN}_3$  ohne TTX.

In Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Untersuchungen sind also ATX II und III in ihrer Bindung an Krebsnerven kompetitiv zu ATX I.

ATX II erscheint hierbei effizienter als ATX III, d.h. es verdrängt schon in geringeren Konzentrationen.

Quantitativ läßt sich das Bindungsverhalten von ATX II und III ebenfalls auswerten.

Es sei  $K_D^I$  die Dissoziationskonstante des kompetierenden Liganden,  $[I_{50}]$  seine Konzentration bei halbmaximaler Verdrängung,  $[L_0]$  die Konzentration von  $^{125}\text{I}$ -ATX I und  $K_D$  die Dissoziationskonstante von  $^{125}\text{I}$ -ATX I.

Dann gilt folgende Gleichung (s. C 2.4.1):

$$K_D^I = \frac{[I_{50}]}{1 + \frac{[L_0]}{K_D}}$$

und mit den Werten  $[I_{50}] = 150 \text{ nM}$  für ATX II,  $[I_{50}] = 400 \text{ nM}$  für ATX III,  $[L_0] = 80 \text{ nM}$  und  $K_D = 5 \text{ nM}$  (in Gegenwart von TTX) (43, 114) ergeben sich Dissoziationskonstanten für die Bindung an Krebsnerven von  $10 \text{ nM}$  für ATX II und  $25 \text{ nM}$  für ATX III (s. jedoch Diskussion B 1.2.4).

In ähnlichen Experimenten wurde der Einfluß von Skorpiontoxin (ScTX) aus dem Venom von Leiurus quinquestriatus (zur Verfügung gestellt von W.A. Catterall) auf die  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung untersucht. Abb. 12 zeigt,

daß auch mit einem bis zu 40fachen Überschuß keine signifikante Konkurrenz mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I demonstriert werden konnte.

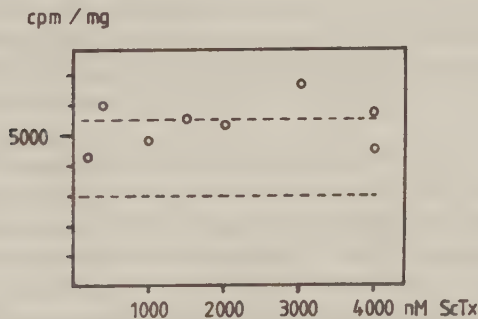


Abb. 12: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I in Gegenwart von ScTX. [ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 100 nM. [TTX]: 50  $\mu\text{M}$ . Der obere Balken gibt die Menge an gebundenem  $^{125}\text{I}$ -ATX I in Abwesenheit von ScTX an, der untere ebenfalls in Abwesenheit von ScTX, jedoch in Gegenwart von 3 mM  $\text{NaN}_3$  ohne TTX.

B 1.2.3 Erhöhung der externen Kaliumkonzentration inhibiert  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung

In früheren Experimenten wurde auf eine Potentialabhängigkeit der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung geschlossen (43, 114) nicht nur aufgrund der schon erwähnten Experimente in Gegenwart von TTX oder  $\text{NaN}_3$ , sondern auch wegen inhibierender Effekte sowohl von Ouabain als auch von Veratridin. Ouabain ist ein spezifischer

Hemmstoff der NaK-ATPase, während Veratridin die Ruheleitfähigkeit der Axonmembran erhöht und damit ebenfalls depolarisierend wirkt.

Obwohl diese Hinweise in ihrer Gesamtheit überzeugend wirken, sind sie doch alle indirekt. Zudem konnten positive oder negative Kooperativität im Bindungsverhalten der getesteten Effektoren mit dem von  $^{125}\text{I-ATX I}$  nicht völlig ausgeschlossen werden.

In einem direkten Experiment zur Potentialabhängigkeit der ATX-Bindung wurde deshalb die externe Kaliumkonzentration auf Kosten der Natriumkonzentration erhöht. Wie in A 1.2 beschrieben, ist das Ruhepotential der Axonmembran in erster Linie ein Kalium-Gleichgewichtspotential; Erhöhung der externen Kaliumkonzentration führt deshalb direkt zu Depolarisierung der Axonmembran. Abb. 13 zeigt die Ergebnisse des Experiments.

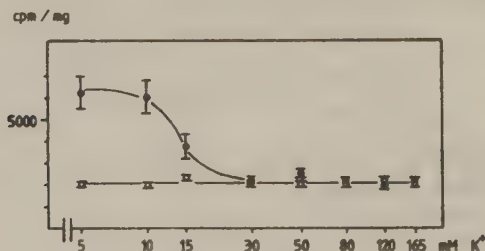


Abb. 13: Bindung von  $^{125}\text{I-ATX I}$  in Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration. [ $^{125}\text{I-ATX I}$ ]: 100 nM. Die externe Kaliumkonzentration wurde wie angegeben erhöht, die Natriumkonzentration in reziproker Weise vermindert.  
 -●-: Bindung in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  TTX  
 -○-: Bindung in Gegenwart von 3 mM  $\text{NaN}_3$ .  
 Die Balken bezeichnen obere und untere Werte von Doppelbestimmungen.

Die Erhöhung der externen Kaliumkonzentration auf 30 mM bewirkt also eine vollständige Beseitigung der spezifischen Bindung. Bei einer angenommenen internen Kaliumkonzentration von 250 mM (dieser Wert wurde für den Krebs Procambarus clarkii gemessen (116)) ergibt das Konzentrationsverhältnis nach der Nernst-Gleichung  $E_K^+ = -58 \text{ mV} \log ([K^+]_i/[K^+]_a)$  ein Nernst-Potential von ca. -50 mV. Das Ruhepotential bei Astacus leptodactylus dagegen beträgt -90 mV (37), d.h. eine Depolarisierung um 40 mV hebt die spezifische ATX I-Bindung auf.

#### B 1.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Ganze Krebsnerven von Astacus leptodactylus sind für viele Untersuchungen brauchbare Präparate. Insbesondere wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch schon in (43, 114) gezeigt, daß die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -markiertem ATX I an neuronale Strukturen (evtl. den Inaktivierungsmechanismus des spannungsabhängigen Natriumkanals) spezifisch und durch natives ATX I verdrängbar ist. Des weiteren wurde in einem direkten Versuch gezeigt, daß Depolarisierung der Axonmembran um einige mV durch Erhöhen der externen Kaliumkonzentration zu vollständiger Beseitigung der spezifischen Bindung führt. Die Spannungsabhängigkeit der ATX-Bindung, bisher durch indirekte Hinweise wahrscheinlich gemacht (43, 114), konnte somit bestätigt werden.

Die Konkurrenzexperimente mit ATX II und III zeigen qualitativ gute Übereinstimmungen mit pharmakologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen: die geringere Affinität von ATX III im Vergleich zu ATX I

und II spiegelt sich wieder in einer dreifach höheren letalen Dosis für die Krabbe Carcinus maenas (ATX III: 6 µg/kg, ATX I und II: 2 µg/kg) (30) sowie in der höheren Schwellenkonzentration für die Verlängerung des Aktionspotentials bei Astacus leptodactylus (ATX III: 100 nM, ATX I und II: 5 nM) (37).

Es ist also anzunehmen, daß alle drei Seeanemonentoxine mit unterschiedlicher Affinität, jedoch gleichem Effekt, an denselben Wirkort binden. .

Weniger klar erscheint die Interpretation der Versuche mit Skorpiontoxin. Es ist allgemein akzeptiert, daß Seeanemonen- und Skorpiontoxine mit derselben Bindungsstelle interagieren (5), eine Verdrängung von ATX I durch Skorpiontoxin sollte deshalb erwartet werden. Jedoch berichten Vincent und Kollegen (117), daß ATX II zwar Skorpiontoxin, nicht aber Skorpiontoxin ATX II aus allen seinen Bindungsstellen an Rattenhirnsynaptosomen verdrängen konnte. Sie erklärten ihre Ergebnisse mit einer größeren Zahl Seeanemonenals Skorpiontoxinbindungsstellen; eine Tatsache, die evtl. auch für Krebsnerven zutreffen könnte.

In einigen Punkten findet vielleicht die Verwendung ganzer Krebsnerven hier ihre Grenzen: So erhält man in der Präparation naturgemäß Nerven verschiedener Länge, Dicke sowie unterschiedlichen "Verletzungsgraden"; dies könnte vielleicht für manche Streuung in den Experimenten (vgl. Abb. 12) verantwortlich sein, obwohl in eigenen Versuchen keine systematischen Abweichungen in Abhängigkeit von Länge oder Dicke der Nerven gefunden wurden.

Auch die langen Inkubationszeiten schaffen Probleme. So sind metabolische Veränderungen des Präparates im Verlauf des Versuchs durchaus wahrscheinlich.

Darüberhinaus ist die exakte Bestimmung des Bindungsgleichgewichtes in ganzen Nerven praktisch unmöglich: weder kann die Konzentration an Bindungsstellen befriedigend angegeben werden, noch die tatsächliche Konzentration des Liganden, der sich im Bindungsgleichgewicht befindet, da sich die vorgegebene Konzentration des Liganden ohne weiteres erheblich von derjenigen unterscheiden kann, die sich nach Equilibrierung des Nerven im Inneren desselben einstellt. Ohne genaue quantitative Beschreibung des Bindungsgleichgewichtes ist jedoch eine exakte Bestimmung von Dissoziationskonstanten (s. C 2.4.1) nicht durchzuführen. Dies wurde in (43, 114) nicht beachtet; die in B 1.2.2 ermittelten Werte seien deshalb auch nur mit Vorbehalt, etwa: relativ zu denen für ATX I, genannt.

Es erschien deshalb sinnvoll, weitere Versuche mit einem anderen System durchzuführen: einer subzellulären Präparation axonaler Membranfragmente. In dieser bestehen keine Diffusionsbarrieren für ATX I, sie ist homogener als ganze Nerven und das Bindungsgleichgewicht sollte zu bestimmen sein.

### B 1.3 Untersuchungen an axonalen Membranfragmenten

#### B 1.3.1 Präparation axonaler Membranfragmente

Crustaceen-Nerven eignen sich gut für solche Präparationen, da ihre Axone keine Markscheide besitzen, d.h. nicht

myelinisiert sind. Dennoch besitzen auch diese Nerven Bindegewebs- und Schwann'sche Zellen. Da histochemische Untersuchungen ergaben, daß der größte Teil der Na/K-ATPase-Aktivität in den Axonmembranen vorliegt (119), entwickelte Denburg /119) eine Präparationsmethode, bei der Membranfragmente mit ca. achtfach angereicherter Na/K-ATPase-Aktivität erhalten wurden in einem mikrosomalen Pellet nach differentieller Zentrifugation eines hypotonischen Extraktes aus Nervengewebe.

Zusätzlich wurde ein axonales Makromolekül mit Affinität für cholinerge Liganden angereichert, das in Nerven des Hummers Homarus americanus verschiedentlich gefunden wurde (119 - 121). Seine Existenz ist jedoch nicht für alle Crustaceen-Nerven gesichert, so berichten Lazdunski und Kollegen (121), daß sie keine solchen Bindungsstellen in Präparaten aus Nerven der Krabben Cancer pagurus und Maia squinado feststellten.

Auch in den Nerven von Astacus leptodactylus scheint ein solches Molekül nicht vorzukommen: die in der vorliegenden Arbeit unternommenen Versuche, Bindung von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin oder  $^3\text{H}$ -Acetylcholin mittels Gleichgewichtszentrifugation nachzuweisen oder eine mögliche Bindungsstelle mit dem photoaktivierbaren Nitroazido-Derivat von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin zu markieren, ergaben keine Hinweise für seine Existenz.

Membranfragmente aus Nerven von Astacus leptodactylus wurden wie in (119) beschrieben hergestellt; Tab. 5 enthält ein Schema der Präparationsschritte sowie die jeweils ermittelte Na/K-ATPase-Aktivität.

| Reinigungsschritt                  | Protein |     | Na/K-ATPase |                  | Ausbeute<br>(%) |
|------------------------------------|---------|-----|-------------|------------------|-----------------|
|                                    | (mg)    | (%) | (nMol/mg·h) | Rein.-<br>faktor |                 |
| Homogenisat H                      | 3,07    | 100 | 120         | 1,0              | 100             |
| ↓ Zentrifug. 15 min<br>1000 g      |         |     |             |                  |                 |
| Überstand S1                       | 1,56    | 50  | 180         | 1,5              | 68              |
| Waschen des Pellets                |         |     |             |                  |                 |
| ↓ Zentrifug. 15 min<br>1000 g      |         |     |             |                  |                 |
| Überstand S2                       | 0,30    | 10  | 240         | 2,0              | 16              |
| Pellet P1                          | 0,52    | 17  | 0           | 0,0              | 0               |
| Vereinigte Überstände<br>S1 und S2 |         |     |             |                  |                 |
| ↓ Zentrifug. 15 min<br>10 000 g    |         |     |             |                  |                 |
| Überstand S3                       | 1,35    | 44  | 140         | 1,2              | 46              |
| Waschen des Pellets                |         |     |             |                  |                 |
| ↓ Zentrifug. 15 min<br>10 000 g    |         |     |             |                  |                 |
| Überstand S4                       | 0,18    | 6   | 250         | 2,1              | 11              |
| Pellet P2                          | 0,13    | 4   | 130         | 1,1              | 5               |
| Vereinigte Überstände<br>S3 und S4 |         |     |             |                  |                 |
| ↓ Zentrifug. 90 min<br>100 000 g   |         |     |             |                  |                 |
| Überstand S5                       | 0,95    | 31  | 0           | 0,0              | 0               |
| 100 000 g-Pellet M                 | 0,32    | 10  | 330         | 2,8              | 30              |

**Tab. 5:** Präparation axonaler Membranfragmente aus Nerven von *Astacus leptodactylus*. S. C 2.2. Ausgangsmaterial waren ca. 160 mg Nerven (Naßgewicht). Die Proteinkonzentration wurde mit der Folinmethode bestimmt (122) (s. C 2.7), die Aktivität der Na/K-ATPase wurde wie in (123) beschrieben als Ouabain-blockierbarer Anteil der gesamten ATPase-Aktivität, das im Test aus ATP abgespaltene Phosphat jedoch turbidometrisch bestimmt wie von Eibl und Lands beschrieben (124) (s. C 2.8)

Der Reinigungsfaktor von 2,8 ist niedriger als der von Denburg (119) erhaltene Wert (8,5), korrespondiert jedoch gut mit dem in (121) genannten Faktor 3,3 für den entsprechenden Reinigungsschritt. Die Ausbeute (30 %) ist ebenfalls nicht so hoch wie die in den erwähnten Arbeiten beschriebene: 60 % bzw. 49 %.

Als weiterer Präparationsschritt ist eine Dichtegradientenzentrifugation beschrieben worden (121), mit der eine weitere bis zu 4,5fache Reinigung erzielt wurde; diesen Autoren standen jedoch Materialmengen zu Verfügung, die für unser Labor geradezu utopisch erscheinen: für eine Präparation verwendeten sie 50-60 g Nerven aus 150 kg Krabben.

Die weiteren Versuche wurden deshalb mit denen auf die beschriebene Weise hergestellten axonalen Membranfragmenten durchgeführt. Abb. 14 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation.

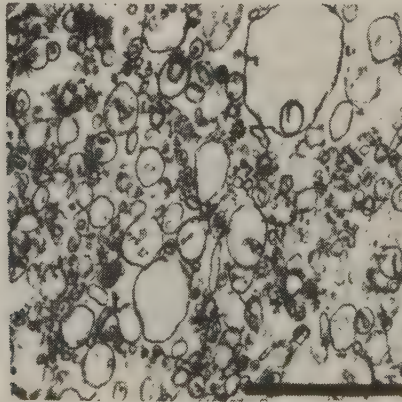


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnitts aus einer Membranpräparation. Der Kalibrierungsbalken mißt 1  $\mu\text{m}$ . Aus (45).

Die Membranfragmente bilden vorwiegend geschlossene Vesikel mit einem Durchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 1  $\mu\text{m}$ .

Mautner und Kollegen zeigten, daß in den mit der Denburg-Methode erhaltenen Membranfragmente aus Nerven von Homarus americanus cholinerge Bindungsstellen durch ein  $\alpha$ -Bungarotoxin-Meerettichperoxidase-Konjugat markiert wurden (120). In derselben Untersuchung demonstrierten die Autoren an ganzen Nerven, daß dieses Konjugat fast ausschließlich mit der Axonmembran und nicht mit der von Schwann'schen Zellen interagierte. Es ist also wahrscheinlich, daß die nach obigem Protokoll hergestellten Membranvesikel zumindest zu einem großen Teil axonalen Ursprungs sind.

Interessant ist die Tatsache, daß die Hauptproteinkomponenten in Präparaten aus Astacus leptodactylus-Nerven bezüglich ihres Molekulargewichtes weitgehend mit denen in noch weiter gereinigten Membranfragmenten aus den Nerven der Krabbe Cancer pagurus identisch sind.

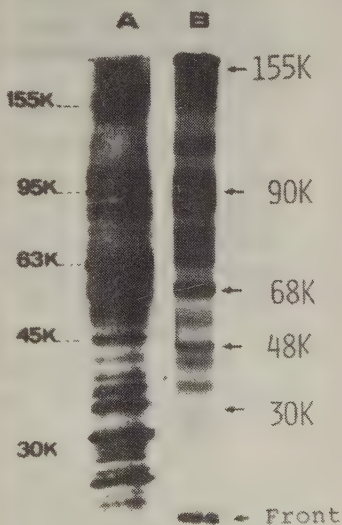
In Abb. 15 wird ein eigenes Experiment hierzu mit einem in (121) veröffentlichten verglichen.

Abb. 15:

Vergleich der Proteinzusammensetzung in Präparationen aus Nerven zweier verschiedener Crustaceenarten.

A: SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese eines Präparates aus Cancer pagurus. Aus (121). Trenngelkonzentration: 10 %. Die angegebenen Molekulargewichte wurden von den Autoren bestimmt.

B: SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (s.C 2.5) nach Lämmli (125) eines eigenen Präparates aus Astacus leptodactylus. Trenngelkonzentration: 7,5 %. Die angegebenen Molekulargewichte sind mit eigenen Eichkurven bestimmt (s. C 2.5).



Das Molekulargewicht einer Hauptbande in Abb. 15 B wurde mit 68 000 bestimmt, die entsprechende Polypeptidkette in Abb. 15 A besitzt ein Molekulargewicht von 63 000 und wurde von den Autoren als Acetylcholinesterase identifiziert. Dies geschah durch kovalente Markierung mit radioaktivem Diisopropylfluorophosphat, einem spezifischen Hemmstoff der Acetylcholinesterase.

Eine andere Bande (Abb. 15 A: 95 000, Abb. 15 B: 90 000) ist die ATP-spaltende Untereinheit der Na/K-ATPase (in (121) durch spezifische Phosphorylierung nachgewiesen).

Eine dritte Bande, in beiden Präparationen prominent vertreten (Abb. 15 A: 45 000, Abb. 15 B: 48 000), ist Actin, nachgewiesen in (121) durch Koelektrophorese mit gereinigten Actinpräparaten. Die Existenz zweier weiterer Banden, in Abb. 15 A mit Molekulargewichten von 30 000 (Tropomyosin) und 155 000 (Identität unklar, wird jedoch ebenfalls phosphoryliert) ist in Abb. 15 B nicht auszuschließen, aber aufgrund geringerer Menge bzw. fehlender Auflösung im Gelsystem nicht sicher nachzuweisen.

Die leicht unterschiedlichen Molekulargewichte in Abb. 15 A und B sind zu erklären durch die Verwendung verschiedener Gelsysteme und unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen, wie überhaupt ihre Bestimmung im denaturierenden SDS-Gel nur mit einer Genauigkeit von ca.  $\pm 10\%$  erfolgen kann.

Insgesamt erschienen die Membranfragmente aus Nerven von Astacus leptodactylus als genügend charakterisiert, um im weiteren Bindungsversuche mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I durchzuführen.

### 1.3.2 Bindung von $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente

#### 1.3.2.1 Entwicklung des Bindungstests

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung eines radioaktiven Liganden an biologisches Material werden vor allem drei Methoden verwendet:

##### - Gleichgewichtsdialyse

Hierbei werden zwei Kompartimente durch eine für den Liganden durchlässige Membran getrennt. In einem Kompartiment liegt rezeptorhaltiges Material und Ligand vor, im anderen nur Ligand. Aus den unterschiedlichen Gesamt-Ligandenkonzentrationen in beiden Kompartimenten kann die Bestimmung der Bindung vorgenommen werden.

##### - Gleichgewichtszentrifugation

Sie ist anwendbar, wenn die Bindungsstellen vollständig und in relativ kurzer Zeit mittels Zentrifugation sedimentierbar sind. Bindung des Liganden wird dann über die Abnahme der Radioaktivität im Überstand nach Zentrifugation gemessen.

##### - Filtrationstest

Hierbei wird eine Mischung von Ligand und rezeptorhaltigem Material filtriert. Der verwendete Filter soll die Bindungsstellen vollständig, ungebundenen Liganden jedoch möglichst wenig zurückhalten. Die Bindung des Liganden kann durch Messen der Radioaktivität des Filters nach dem Filtriervorgang direkt bestimmt werden.

Von der Verwendung der Gleichgewichtsdialyse für unser System wurde von vornherein abgesehen: Die nötigen langen Dialysezeiten ließen die Methode als eher unpraktisch erscheinen.

Erste Versuche,  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung an axonale Membranfragmente mittels Gleichgewichtszentrifugation zu bestimmen, schlugen fehl. Der Grund liegt wahrscheinlich in der zu geringen Bindungskapazität der Membranfragmente, so daß der Unterschied in der Radioaktivität des Überstandes vor und nach Zentrifugation im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht hoch genug war.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, diese Messungen mit einem Filtrationstest vorzunehmen. Filtrationstests bieten u.a. folgende Vorteile: sie sind schnell und einfach durchzuführen, die Trennung des freien von gebundenem Liganden erfolgt innerhalb von Sekunden und die Messung von Bindungskinetiken im Minutenbereich ist möglich.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Tests ist allerdings eine genügend hohe Affinität des Liganden ( $K_D$  möglichst im nanomolaren Bereich), so daß während des Filtrations- und Waschvorgangs keine signifikante Dissoziation des gebundenen Liganden stattfindet. Wichtig ist die Wahl des Filtertypen: eine zu hohe unspezifische Adsorption kann spezifische Bindung vollständig maskieren. Für  $^{125}\text{I}$ -ATX I ergaben sich die niedrigsten Werte mit dem Amicon Diapor Membran-Filter. Bei gleichen Filtrationsbedingungen wurde z.B. an den Selectron BA 85 Filter (Porendurchmesser bei beiden Filtertypen:  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) sechsmal mehr  $^{125}\text{I}$ -ATX I

(10,7 % der eingesetzten cpm) adsorbiert als an den Amicon Filter (1,8 % der eingesetzten cpm). Im Laufe der Versuche konnte dieser Wert durch verbesserte Bedingungen noch um mehr als das zehnfache auf 0,13 % verringert werden. Hierzu erwies sich die Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als vorteilhaft.

Wie schon erwähnt, adsorbiert ATX I als kleines basisches Peptid an viele Oberflächen. Es fiel auf, daß bei gleichen eingesetzten Mengen von  $^{125}\text{I}$ -ATX I (bei nanomolaren Konzentrationen) die cpm-Werte in Lösungen, die Membranfragmente enthielten (Proteinkonzentration: 0,5 bis 1 mg/ml) durchgängig höher lagen als in Lösungen ohne Proteinbestandteile. Die Verluste an cpm betrugen hierbei bis zu 60 %. Es lag nun die Vermutung nahe, daß in proteinhaltigen Lösungen die Adsorption von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an Gefäßwände (meistens wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet) drastisch verringert war.

Tatsächlich konnte der beschriebene Adsorptionseffekt durch die Zugabe von 1 mg/ml BSA in alle  $^{125}\text{I}$ -ATX I enthaltenden Lösungen verhindert werden.

Die Equilibrierung der Filter mit BSA-haltigen Lösungen erwies sich ebenfalls als vorteilhaft, hierdurch konnte die unspezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I, der "Leerwert", vermindert werden.

Weitere Reduktion der Leerwerte erbrachte die Anwesenheit von BSA in der Waschlösung, mit der der Filter durchspült wurde.

Als günstigstes Versuchsprotokoll stellte sich heraus:

- Inkubation der zu filtrierenden Lösungen in Gegenwart von 1 mg/ml BSA bei 20 - 22° C. Dies war gewöhnlich Raumtemperatur, lag diese unter oder über diesen Grenzwerten, wurde im Wasserbad thermostatisiert.
- Mindestens einstündige Inkubation der Filter vor Gebrauch in Puffer enthaltend 10 mg/ml BSA.
- Verdünnen der 100-200 µl zu filtrierender Lösung unmittelbar vor Filtration in 3 ml eiskalten Puffer (BSA 1 mg/ml); hierdurch konnten Bindungsreaktionen zu definierten Zeitpunkten gestoppt werden.
- Sofort nach Verdünnung Filtration im Wasserstrahlvakuum, danach dreimaliges Waschen der Filter mit jeweils 3 ml eiskaltem Puffer (BSA 1 mg/ml). Der gesamte Filtrationsvorgang nimmt 10 bis 15 sec in Anspruch.
- Messung der Radioaktivität der Filter mit 0,2 ml H<sub>2</sub>O in 5 ml Dioxan/Omnifluor 8 g/l.

Unter diesen Bedingungen wurde im Leerwert tatsächlich nur unspezifische Bindung von <sup>125</sup>I-ATX I an den Filter gemessen; d.h. er war in Gegenwart und Abwesenheit eines Überschusses an nativem ATX I gleich hoch.

In Gegenwart von Membranfragmenten konnte die Bindung von <sup>125</sup>I-ATX I zeitabhängig verfolgt werden (Abb. 16).

cpm / Filter

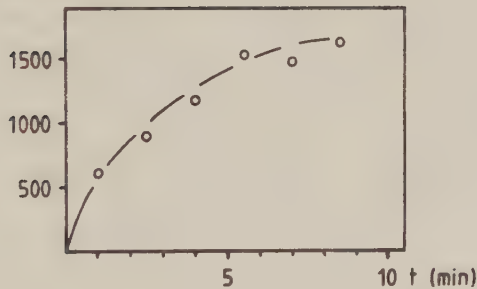


Abb. 16: Spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente. [ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 50 nM. Proteinkonzentration: 0,68 mg/ml. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert (s. B 1.3.3.2). Zu den angegebenen Zeiten nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer wurden jeweils 180  $\mu\text{l}$  auf die beschriebene Weise filtriert. Angegeben ist die spezifische Bindung, d.h. die Differenz der gemessenen Werte in Abwesenheit (Gesamtbindung) und Anwesenheit (unspezifische Bindung) eines Überschusses an nativem ATX I (10  $\mu\text{M}$ ).

Um Aussagen über das Ausmaß der Dissoziation von gebundenem  $^{125}\text{I}$ -ATX I während des Filtrationsvorganges machen zu können, wurde ein Versuch zur Dissoziations-Kinetik unternommen (Abb. 17).

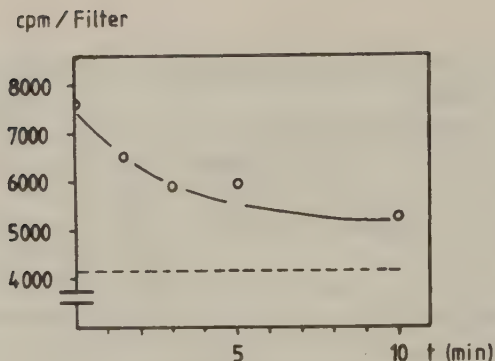


Abb. 17: Dissoziation von gebundenem  $^{125}\text{I}$ -ATX I. [ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 70 nM. Proteinkonzentration: 0,6 mg/ml. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert und wurden zur Inkubation in  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt (s. B 1.3.3.2). Nach 6 min Inkubation wurde der gesamte Ansatz 1:17,6 in eiskaltem  $\text{Na}^+$ -Ringer (BSA 1 mg/ml) verdünnt (entspricht der Verdünnung 180  $\mu\text{l}$ :3,18 ml) und danach zu den angegebenen Zeiten 3,18 ml filtriert und mit 3 x 3 ml wie beschrieben gewaschen. Die gestrichelte Linie bezeichnet das Ausmaß an Bindung, das nach 6 min Inkubation in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ATX I auf die übliche Weise gemessen wurde.

$^{125}\text{I}$ -ATX I dissoziiert also nach Verdünnung bei  $0^\circ\text{C}$  mit einer Halbwertszeit im Minutenbereich, der Filtrationstest erscheint also durchaus anwendbar.

Genaue Aussagen zur Kinetik können mit dem beschriebenen Versuch allerdings nicht gemacht werden; so würden z.B. Dissoziationsgeschwindigkeiten mit Zeitkonstanten im Millisekunden- bis Sekundenbereich mit diesen Messungen nicht entdeckt werden.

#### B 1.3.2.2 Anwendung des Bindungstests

Die Bindung von ATX ist potentialabhängig. Bei Versuchen mit Membranfragmenten steht der Experimentator deshalb vor dem Problem, über der Vesikelmembran ein Potential zu erzeugen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch das Herstellen unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen inner- und außerhalb der Membranvesikel versucht.

Hierzu wurde das bei der Membranpräparation nach dem letzten Zentrifugationsschritt erhaltene Pellet zunächst in einem geringen Volumen  $K^+$ -reichen Mediums aufgenommen (165 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 0,1 mM PMSF, 10 mM HEPES pH 7,4; im Folgenden als " $K^+$ -Ringer" bezeichnet) und über Nacht bei  $4^\circ C$  darin inkubiert.

Die Proteinkonzentration in dieser Membransuspension betrug im Allgemeinen 4 bis 10 mg/ml.

Die Inkubationszeit über Nacht sollte auf alle Fälle ausreichen, um durch Diffusion die Ionenkonzentration im Inneren der Vesikel der im Außenmedium zumindest anzugleichen.

Zum Start der Bindungsreaktion wurden die equilibrierten Vesikel dann in  $Na^+$ -reiches Medium 1:10 verdünnt (160 mM NaI, 5 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 0,1 mM PMSF, 10 mM HEPES pH 7,4; im Folgenden als " $Na^+$ -Ringer" bezeichnet).

Nach der Verdünnung in  $Na^+$ -Ringer sind die "physiologischen" Konzentrationsverhältnisse wieder hergestellt,

d.h. außen hohe Natrium-, innen hohe Kaliumionenkonzentration und der Aufbau eines Kaliumdiffusionspotentials ist zu erwarten (vgl. A 1.2).

Im Gegensatz hierzu sollte bei der Verdünnung in  $K^+$ -Ringer kein solches Potential entstehen.

Erste Experimente in dieser Hinsicht schienen die Richtigkeit obiger Überlegungen zu bestätigen, wobei die Verdünnung in  $Na^+$ -Ringer in Gegenwart von  $50 \mu M$  TTX durchgeführt wurde, um ein evtl. entstehendes Potential zu stabilisieren.

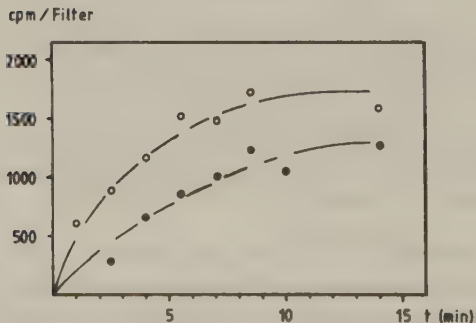
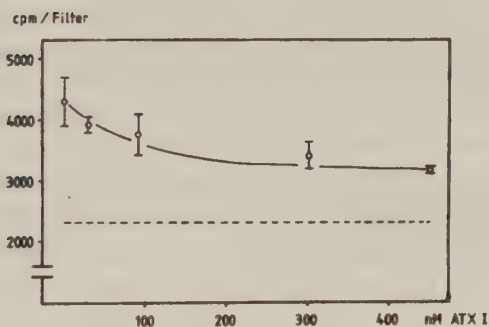


Abb. 18: Bindung von  $^{125}I$ -ATX I an axonale Membranfragmente.  
[ $^{125}I$ -ATX I]:  $50 \text{ nM}$ . Proteinkonzentration:  $0,68 \text{ mg/ml}$ . Membranen waren in  $K^+$ -Ringer equilibriert.  
Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Verdünnung wurden wie in C 2.4.3 beschrieben  $180 \mu l$  filtriert.  
(-o): Bindung nach Verdünnung in  $Na^+$ -Ringer in Gegenwart von  $50 \mu M$  TTX.  
(-●-): Bindung nach Verdünnung in  $K^+$ -Ringer ohne TTX. Angegeben ist spezifische Bindung, d.h. die Differenz der gemessenen Werte in Abwesenheit und Anwesenheit von  $10 \mu M$  nativem ATX I.

In diesem Versuch wurde also nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer deutlich mehr  $^{125}\text{I}$ -ATX I gebunden als nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer. Diese Bindung ist durch ATX I verdrängbar.



**Abb. 19:** Verdrängung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I durch natives ATX I.  
 $[^{125}\text{I}\text{-ATX I}]$ : 50 nM. Proteinkonzentration: 0,5 mg/ml.  $[\text{TTX}]$ : 50  $\mu\text{M}$ . Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert, verdünnt wurde in  $\text{Na}^+$ -Ringer. Bindungstest wie in C 2.4.3, filtriert wurden 140  $\mu\text{l}$  10 min nach Verdünnung. Die Balken bezeichnen obere und untere Werte von Doppelbestimmungen, die gestrichelte Linie den Filter-Leerwert.

Die in Abb. 18 wahrscheinlich gemachte Potentialabhängigkeit der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung war in dieser Form jedoch nicht durchgängig zu demonstrieren (s.u.), in einigen Fällen ergab die Verdünnung in  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Ringer keine signifikanten Unterschiede in der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung. Zudem war auch die Bindung nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer immer durch natives

ATX verdrängbar, d.h. spezifisch, selbst wenn sie wie in Abb. 18 geringere Werte erreichte als nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer.

Bei dem in Abb. 19 gezeigten Experiment z.B. sind die entsprechenden Werte nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer  $4540 \pm 430$  cpm/Filter in Abwesenheit und  $3000 \pm 250$  cpm/Filter in Anwesenheit von 450 nM nativem ATX I. In diesem Fall war die Bindung also unabhängig vom Verdünnungsmedium, was verschiedene Ursachen haben kann: entweder sie war von vornherein potentialunabhängig oder ein evtl. entstandenes Potential war nach 10 min (zu diesem Zeitpunkt nach Verdünnung wurden die Aliquots filtriert) wieder zusammengebrochen, was ebenfalls zu den beschriebenen Verhältnissen geführt hätte.

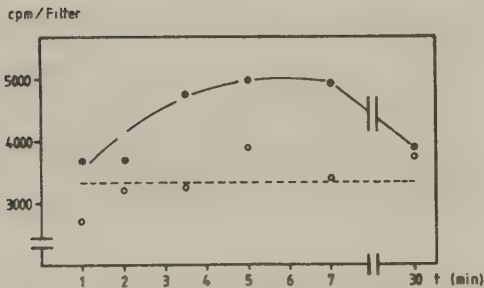


Abb. 20: Legende siehe nächste Seite

Abb. 20: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente.  
[ $^{125}\text{I}$ -ATX I]: 80 nM. Proteinkonzentration: 0,25 mg/ml. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert.  
(-●-): Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  TTX.  
(-o-): Bindung nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer; die gestrichelte Linie bezeichnet das arithmetische Mittel der gemessenen Werte.  
Der Bindungstest wurde wie in C 2.4.3 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 180  $\mu\text{l}$  direkt ohne vorherige Verdünnung in 3 ml Ringer/BSA filtriert wurden.

Ein instabiles Potential könnte z.B. dann entstehen, wenn die in der Präparation erhaltenen Vesikel so durchlässig sind, daß sich die Ionenkonzentrationen inner- und außerhalb in wenigen Minuten angleichen können.

Um Aussagen zur Affinität der Bindung machen zu können, wurden Versuche mit steigenden Konzentrationen an  $^{125}\text{I}$ -ATX I durchgeführt.

Abb. 21:

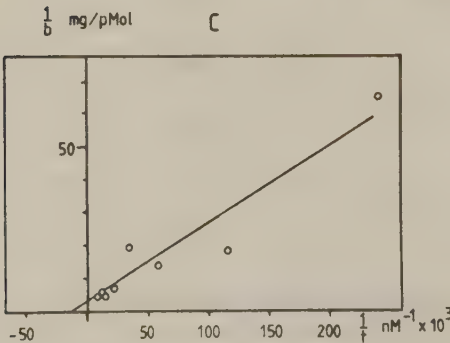
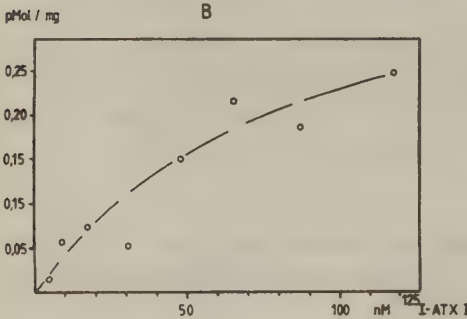
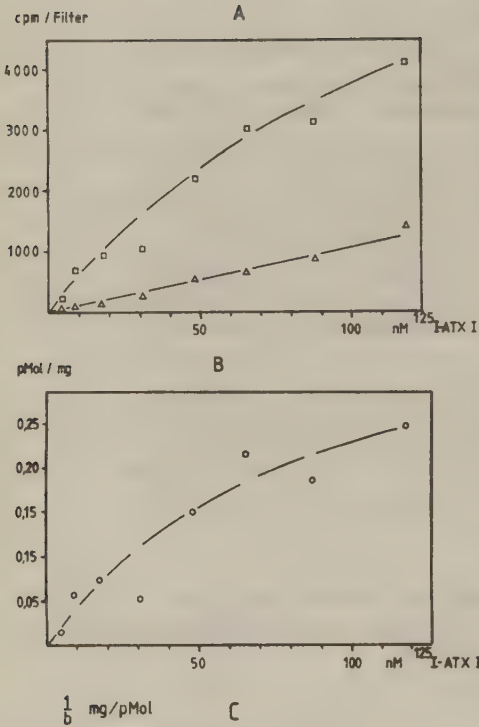
Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente.

Proteinkonzentration: 0,75 mg/ml. [TTX]: 50  $\mu\text{M}$ . Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert. 3,5 min nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer wurden 130  $\mu\text{l}$  wie in C 2.4.3 beschrieben filtriert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

A: ( $\square$ ): Gesamtbindung und ( $\triangle$ ): unspezifische Bindung in Gegenwart von 15  $\mu\text{M}$  nativem ATX I. Die Leerwerte, entsprechend der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an die Filter in Abwesenheit von Membranen, wurden abgezogen.

B: Spezifische Bindung als Differenz der Werte für Gesamtbindung und unspezifische Bindung in A.

C: Doppelt reziproke Auftragung der Werte aus B.



Eine eindeutige Analyse dieses Bindungsversuches ist nicht möglich. So fällt eine relativ hohe Streuung der Werte auf, die verschiedene Ursachen haben kann (s. Diskussion).

Darüberhinaus ist eine Sättigung der Bindung im gewählten Konzentrationsbereich nicht klar erkennbar. Weitergehende Versuche mit höheren Konzentrationen an  $^{125}\text{I}$ -ATX I machten hierzu ebenfalls keine klaren Aussagen möglich, da die absoluten Schwankungen z.B. der Leerwerte das Signal/Rausch-Verhältnis zu klein werden ließen. Für diese Experimente hätte eine bedeutend höhere als die verwendete Konzentration an Bindungsstellen zur Verfügung stehen müssen, die sich jedoch aufgrund materieller Beschränkungen nicht in genügendem Maße erreichen ließ.

Um wenigstens eine ungefähre quantitative Auswertung des Versuches vorzunehmen, wurde die doppelt reziproke Auftragung in Abb. 21 C vorgenommen (s. C 2.4.1).

Aus ihr ergibt sich eine  $K_D$  von 75 nM und eine maximale Anzahl von Bindungsstellen von 0,33 pMol/mg Protein. Diese Werte jedenfalls ließen sich mehr oder weniger reproduzieren, so wurden in einem analogen Experiment wie dem in Abb. 21 gezeigten, bei dem die Bindung 17 min nach Verdünnung gemessen wurde, eine Dissoziationskonstante im Bereich 50 - 100 nM sowie maximale Bindungskapazität von 0,28 pMol/mg Protein gefunden.

Trotz der aufgeführten Einschränkungen ist die gemessene  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung spezifisch für axonale Membranfragmente. Dies zeigte ein Versuch, bei

dem das in Abb. 21 beschriebene Experiment mit AChR-reichen Membranfragmenten aus Torpedo marmorata (s. B 2) wiederholt wurde. Diese Vesikel enthalten als Proteinanteil fast ausschließlich AChR. Da gezeigt wurde, daß Seeanemonentoxine postsynaptisch nicht wirken (37), war nicht anzunehmen, daß ATX I an diese Membranfragmente spezifisch bindet.

Tatsächlich waren die Werte für "Gesamtbindung" und "unspezifische Bindung" im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch, die für unspezifische Bindung lagen teilweise sogar über denen für Gesamtbindung (vgl. dagegen Abb. 21 A).

Wie oben erwähnt, erbrachte die Verdünnung der in  $K^+$ -Ringer equilibrierten Axon-Membranfragmente in  $Na^+$ - oder  $K^+$ -Ringer nicht in jedem Fall unterschiedliche Werte für die  $^{125}I$ -ATX I-Bindung. Bei den insgesamt vierzehn mit verschiedenen Membranpräparationen unternommenen Versuchen zu diesem Problem konnte dies in nur sechs Fällen, also knapp der Hälfte aller Untersuchungen, gezeigt werden. Zwei Erklärungen sind für die mangelnde Reproduzierbarkeit denkbar:

- Bei den verschiedenen Präparationen entstanden in unterschiedlichem Maße durchlässige Vesikel, mit denen nicht jedesmal ein Potential erzeugt werden konnte.
- Während der Präparation ging in manchen Fällen die Eigenschaft verloren, die die Bindung von ATX I potentialabhängig macht.

Um zwischen diesen Erklärungsmöglichkeiten unterscheiden zu können, mußte die Entstehung eines Potentials mit anderen Methoden als der Bindung von

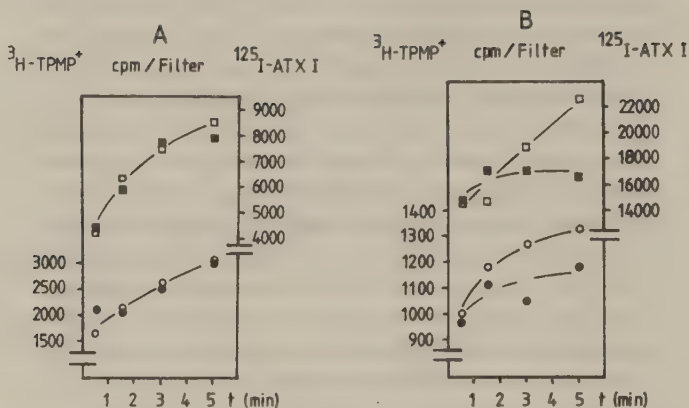
$^{125}\text{I}$ -ATX I nachgewiesen werden. Dies geschah durch Messung der Akkumulierung von tritiiertem Methyltriphenylphosphonium ( $^3\text{H-TPMP}^+$ )\*.  $^3\text{H-TPMP}^+$  gehört zu einer Gruppe lipophiler Kationen, die zur Messung von Membran-Potentialen in elektrophysiologisch nicht zugänglichen Systemen verwendet werden (s. B 2.1). Sie können aufgrund ihrer Lipophilie ohne weiteres biologische Membranen durchdringen und reichern sich als Ionen mit positiver Ladung entsprechend einem evtl. bestehenden Potential (innen negativ) im Vesikelinneren an. Die Existenz eines Potentials kann somit zumindest qualitativ gezeigt werden; ist das innere Volumen des untersuchten Systems bekannt, wird mit Hilfe der Nernst-Gleichung auch eine quantitative Beschreibung möglich.

In den sechs Versuchen, in denen  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung in axonale Membranfragmente gemessen wurde, war diese in drei Experimenten nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer im Vergleich zu der nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer stimuliert, das Bestehen eines Potentials also wahrscheinlich. In den übrigen drei Fällen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Mit zwei Präparationen wurde  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung und  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung parallel gemessen, die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

---

\*: Die "logischere" Abkürzung wäre natürlich  $\text{MTPP}^+$ , jedoch ist " $\text{TPMP}^+$ " in einem solchen Ausmaß in die Literatur eingegangen, daß seine Verwendung auch in dieser Arbeit gerechtfertigt erscheint.



**Abb. 22:**  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung und  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung.  
 In A und B sind Experimente mit zwei verschiedenen Präparationen dargestellt.  
 $[^{125}\text{I-ATX I}]$ : 140 nM.  $[^3\text{H-TPMP}^+]$ : 100 nM.  
 Proteinkonzentration: 0,66 mg/ml (A); 0,35 mg/ml (B).  
 Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert.  
 Offene Symbole: Akkumulierung bzw. Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer, ausgefüllte Symbole: dasselbe nach Verdünnung in  $\text{K}^+$ -Ringer.  
 (—○—, —●—, —):  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung (s. C 2.4.3)  
 Die unterschiedlichen cpm-Zahlen in A und B werden erklärt durch die Verwendung von  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Chargen mit verschiedener spezifischer Radioaktivität.  
 (—□—, —■—):  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung. Die Messung erfolgt mit einem Filtrationstest analog zu dem für  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung.  
 Es wird jedoch nur mit 2 x 3 ml nachgewaschen sowie der Millipore Celotat-Filter (Porendurchmesser 0,45  $\mu\text{m}$ ) verwendet (s. C 2.4.4).

Bei der Präparation aus Abb. 22 A konnte also kein Potential erzeugt werden; die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung ist nach Verdünnen in beide Medien gleich. Auch die  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung bleibt vom Verdünnungsmedium unbeeinflusst.

Anders bei der Präparation aus Abb. 22 B: hier belüftet sich die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung nach Verdünnen in  $\text{Na}^+$ -Ringer auf höhere Werte; ein Potential besteht. Parallel dazu erscheint auch die  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung stimuliert.

Die Versuche zur  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung zeigten, daß bei ungefähr der Hälfte der Membranpräparationen von vornherein kein Potential erzeugt werden konnte. Dadurch kann die Tatsache erklärt werden, daß in ebenfalls ca. 50 % der dazu unternommenen Versuche die Bindung von  $^{125}\text{I-ATX I}$  von der Natur des Verdünnungsmediums unabhängig war; der Verlust der für die potentialabhängige Bindung verantwortlichen Eigenschaft während der Präparation muß also nicht unbedingt hierfür verantwortlich gemacht werden.

Einen weiteren starken Hinweis, daß diese Eigenschaft während der Präparation erhalten werden kann, liefern die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse: wenn ein Potential besteht, dann ist auch die  $^{125}\text{I-ATX I}$ -Bindung stimuliert.

#### B 1.3.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Bindung von  $^{125}\text{I-ATX I}$  an axonale Membranfragmente konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig quantitativ beschrieben werden.

Ein wichtiger Grund hierfür sind gewisse "unberechenbare" Eigenschaften des Moleküls ATX I. Die schon beschriebene Adsorption an Oberflächen macht reproduzierbares Arbeiten schwierig, wenn nicht gar unmöglich. So ist bei wiederholten Pipettierungen trotz

größtmöglicher Sorgfalt mit einem Fehler von wenigstens 5 % zu rechnen; diese Tatsache macht die saubere Durchführung eines Bindungstests fast unmöglich. Im Vergleich hierzu erweist sich die Handhabung anderer radioaktiver Liganden als bedeutend unproblematischer, es sei hier z.B. auf die in B 2 beschriebenen Versuche mit  $^3\text{H}$ -Acetylcholin oder  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup> hingewiesen.

Ein anderer Unsicherheitsfaktor resultiert aus der Potentialabhängigkeit der ATX I-Bindung. Obwohl das Herstellen eines Potentials im Prinzip möglich ist, wie die Versuche zur  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup>-Akkumulierung zeigen, wurden nicht bei jeder Membranpräparation "polarisierbare" Vesikel erhalten. Die hierfür verantwortlichen Faktoren konnten im Verlauf der Versuche nicht identifiziert werden.

Wahrscheinlich ist jedenfalls, daß die Eigenschaft des Natriumkanals, die ATX I spannungsabhängig binden läßt, in der Präparation nicht verloren geht, bzw. nicht in jedem Fall verloren gehen muß.

So wird ein Bindungstest mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I nicht nur durch mangelnde Reproduzierbarkeit erschwert, er ist auch nicht unter eindeutig definierten Bedingungen durchzuführen, da es unmöglich ist, in einem Experiment wie dem in Abb. 21 gezeigten zugleich Polarisierbarkeit der Vesikel sowie Potentialabhängigkeit und Kinetik der Bindung zu messen und diese Verhältnisse für jeden Punkt der Bindungskurve sicherzustellen.

Eine Tatsache erscheint allerdings gesichert: die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an axonale Membranfragmente ist verdrängbar, obwohl keine Saturierbarkeit gezeigt werden konnte. Die einfachste Erklärung hierfür wäre zwar das Vorkommen einer großen Zahl von Bindungsstellen mit geringer Affinität, wie sie sich z.B. aus der Adsorption von ATX I an die Lipidmembran der Vesikel ergeben würde. Die andere Möglichkeit jedoch ist, daß diese Bindungsstellen zu nicht polarisierten Vesikeln gehören, die ja ebenfalls verdrängbar binden (s.o.). Dies ist sogar eher wahrscheinlich, da ja an Torpedo-Membranvesikel keine verdrängbare Bindung gemessen wurde, die Bindungskapazität der unspezifischen Wechselwirkung mit der Lipidphase, die zweifellos vorhanden ist, also noch größer ist als die der an axonale Membranfragmente gemessenen Bindung. Zudem gab die Extrapolation der Werte in der doppelt reziproken Auftragung eine maximale Anzahl der Bindungsstellen von ca. 0,3 pMol/mg Protein, was nicht unvernünftig hoch ist: mit  $^3\text{H}$ -TTX wurden z.B. in Membranpräparationen aus Krabbennerven 3 pMol/mg gemessen (121).

Die Existenz von Bindungsstellen mit hoher Affinität, jedoch geringer Anzahl, also evtl. auf einem kleineren Anteil von Vesikeln mit Membranpotential, kann dabei nicht ausgeschlossen werden, wäre jedoch bei einem Experiment wie dem in Abb. 21 wegen der großen Streuung der Meßpunkte nicht zu zeigen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erscheint es also wenig sinnvoll, weitergehende Versuche, etwa zur Reinigung der axonalen Membranfragmente, mit

$^{125}\text{I}$ -ATX I als Ligand im Bindungstest durchzuführen. Hierfür wäre wohl  $^3\text{H}$ -TTX vorzuziehen. Aus dem Vergleich der Bindungsdaten von  $^{125}\text{I}$ -ATX I und  $^3\text{H}$ -TTX ließen sich dann sicherlich interessante Erkenntnisse gewinnen, während die Interpretation nur von Versuchen mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I durch zu viele Unsicherheitsfaktoren beeinträchtigt wird.

Dies zeigte sich auch bei Experimenten, die zur kovalenten Markierung der ATX I-Bindungsstelle(n) unternommen wurden.

#### B 1.3.3 Versuche zur kovalenten Markierung der $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindungsstelle

Die Menge an Information, die aus reversiblen Bindungsstudien gewonnen werden kann, ist in Quantität und Qualität begrenzt. So sind zwar Aussagen möglich über Spezifität und Affinität der Bindung eines Liganden, und auch aus Konkurrenzexperimenten können wertvolle Erkenntnisse erhalten werden; die molekulare Struktur der Bindungsstelle kann mit diesen Versuchsergebnissen jedoch nicht befriedigend beschrieben werden. Insbesondere ist dies der Fall, wenn eine membrangebundene Einheit wie der Natriumkanal untersucht wird und zunächst nur Präparate vorliegen, die eine sehr komplexe Zusammensetzung aufweisen.

Durch kovalente Verknüpfung des Liganden mit seiner Bindungsstelle sollten auch hier Aussagen zur Struktur möglich sein. Auch bei gereinigten und sehr gut charakterisierten Präparaten wie den

AChR-reichen Membranfragmenten (s. B 2) sind solche Untersuchungen von hohem Werte, wenn es gilt, die Funktion der einzelnen Untereinheiten des Rezeptorkomplexes zu bestimmen.

Bei allen Experimenten in dieser Richtung wird nach reversibler Bindung des radioaktiv markierten Liganden eine kovalente Reaktion mit seiner Bindungsstelle eingeleitet; nach einer darauffolgenden denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kann dann die Radioaktivität einzelner Banden entweder direkt durch Messung im Szintillationszähler oder autoradiographisch bestimmt werden. Der Nachweis der Spezifität der Markierung erfolgt auch hier durch den Vergleich der Ergebnisse in Abwesenheit und Anwesenheit eines Überschusses an kompetierendem Liganden: die Markierung der spezifischen Bindungsstelle sollte inhibierbar sein.

Prinzipiell stehen für die kovalente Markierung drei Methoden zur Auswahl:

- die Verwendung von Photoaffinitätsreagenzien,
- bifunktionelle Reagenzien,
- Anregung durch UV-Licht.

S. Stengelin synthetisierte in unserem Labor aus ATX I ein Photoaffinitätsreagenz. Hierzu wurde, wie dies auch bei den meisten ähnlichen Versuchen dieser Art geschah (126), der Ligand (ATX I) mit einem Arylazid (4-Fluoro-3-nitrophenylazid) umgesetzt und radioaktiv markiert. Nach reversibler Bindung des Liganden entsteht bei Bestrahlung aus der Azidogruppe durch photolytische Zersetzung ein

Nitren, das seinerseits mit benachbarten Gruppen (z.B. der Bindungsstelle) kovalent reagiert. In vorläufigen Experimenten wurde so ein Peptid der Axonmembran mit einem Molekulargewicht von 53 000 spezifisch markiert (43, 45).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, die beiden anderen Strategien, nämlich die Vernetzung durch bifunktionelle Reagenzien bzw. durch UV-Licht zur Identifizierung der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindungsstelle anzuwenden.

#### B 1.3.3.1 Bifunktionelle Reagenzien

Die meistverwendeten Reagenzien dieser Gruppe sind binfunktionelle Verbindungen der allgemeinen Struktur  $\text{X}-\text{X}$ . Die reaktive Gruppe X kann dabei Eigenschaften haben, die sie bevorzugt mit bestimmten Gruppen eines Makromoleküls reagieren läßt. "Musterbeispiel" dieser Klasse ist Dimethylsuberimidat, das von Davies und Stark zur Quartärstrukturbestimmung oligomerer Proteine vorgeschlagen wurde (127). Bis-Imidoester reagieren spezifisch mit Aminogruppen.

Eine andere oft verwendete Klasse von Reagenzien ist die der Aryldihalogenide wie 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol, die durch nukleophile Substitution ebenfalls mit Aminogruppen reagieren können.

Auch heterobifunktionelle Reagenzien wie das schon erwähnte 4-Fluoro-3-nitrophenylazid gelangen in neuerer Zeit immer häufiger zur Anwendung.

Wie in der Arbeit von Davies und Stark wurden Vernetzungsreagenzien bisher meist zu Untersuchungen der Struktur oligomerer Proteine oder noch komplexerer Strukturen wie z.B. Ribosomen verwendet. Ergebnisse dieser Untersuchungen sind u.a. in (128) zusammengefaßt.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit eröffneten Pilz und Czech, die zeigen konnten, daß Insulin kovalent und irreversibel mit seinem Rezeptor verknüpft werden kann (129). In der Folge führte dies zur Identifizierung der Insulinbindungsstelle in denaturierenden SDS-Gelen (130), sowie in analoger Weise zur kovalenten Markierung der Rezeptoren für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (131) und für Gonadotropin (132).

Zur Markierung der  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindungsstelle wurde zunächst die Verwendung von Dimethylsuberimidat in Erwägung gezogen. Die Reaktion dieses Reagenz mit Aminogruppen hat ihr pH-Optimum im basischen Bereich (vgl. z.B. (133)). Kontrollversuche zeigten nun, daß die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -ATX I an Membranfragmente bei basischem pH stark inhibiert war, so daß nach Reagenzien gesucht wurde, die auch im Neutralen gut vernetzen. Diese wurden mit den Arylhalogeniden 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol (FFDNB) bzw. 4,4'-Difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfon (FFDS) gefunden (Abb. 23).

Unter den beschriebenen Bedingungen vernetzen also FFDNB und FFDS, wie das Entstehen von Di- und Trimeren der Glutamatdehydrogenase zeigt.

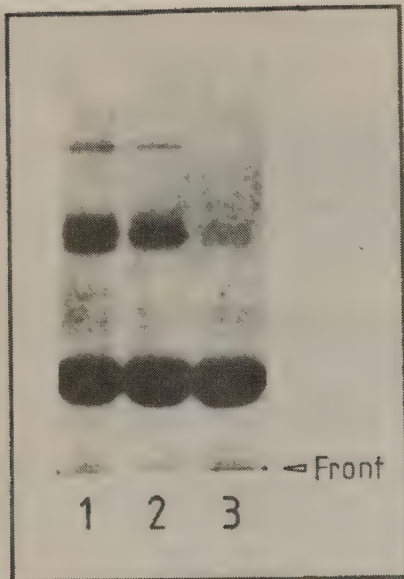


Abb. 23:

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. C 2.5).

5 % -Gel; Coomassie-Blau Färbung.

Spur 1-3: Glutamatdehydrogenase (50 µg).

Spur 1: Vernetzung mit FFDNB 0,18 mg/ml (0,88 mM);

Spur 2: Vernetzung mit FFDS 0,27 mg/ml (0,79 mM);

Spur 3: keine Vernetzung.

FFDNB und FFDS wurden zum Start der Vernetzung aus einer Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) 1:55 verdünnt.

Konzentration der Glutamatdehydrogenase: 0,83 mg/ml.

Die Vernetzungsreaktion lief 30 min bei Raumtemperatur in Na<sup>+</sup>-Ringer und wurde durch Zugabe von 1 % SDS (Endkonzentration) gestoppt.

Dieses Enzym liegt nativ als Hexamer vor, so daß theoretisch bei der Vernetzung auch noch Tetra-, Penta- und Hexamere entstehen sollten. Hierzu waren jedoch die angewendeten Konzentrationen an Vernetzer zu gering (vgl. z.B. (133)), bei den dort beschriebenen Versuchen entstanden tatsächlich auch Hexamere bei einer Dimethylsuberimidat-Konzentration von 2 mg/ml, d.h. 7,4 mM).

Interessant ist das Auftreten des Glutamatdehydrogenase-Dimers nach Vernetzung mit FFDNB mit drei verschiedenen scheinbaren Molekulargewichten. Dies könnte daher rühren, daß das Dimer nach Vernetzung in drei verschiedenen Konformationen fixiert wird, die auch nach Denaturierung durch SDS unterschiedlich bleiben und so in der Elektrophorese bei tatsächlich identischen Molekulargewichten dennoch unterschiedliche Laufstrecken aufweisen.

Wenngleich auch FFDS und FFDNB die Glutamatdehydrogenase mit gleicher Effektivität zu vernetzen schienen, so zeigte sich, daß für die kovalente Verknüpfung von  $^{125}\text{I-ATX I}$  mit Polypeptidketten der Membranfragmente FFDNB besser geeignet war als FFDS.

Bei diesen Experimenten wurde für die reversible Bindung von  $^{125}\text{I-ATX I}$  ähnliche Bedingungen gewählt wie in B 1.3.3 beschrieben: in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibrierte Membranen wurden 1:10 in  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt und 5 min bei  $20\text{--}22^\circ\text{C}$  mit  $^{125}\text{I-ATX I}$  inkubiert (mit oder ohne Überschuß an nativem ATX I). Danach erfolgte die Vernetzungsreaktion durch Zugabe eines kleinen Aliquots an Reagenz. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurden die Membranfragmente 30 min in der Airfuge zentrifugiert, um ungebundenes  $^{125}\text{I-ATX I}$  zu entfernen. Das Pellet wurde in Sammelgelpuffer (s. C 2.5) mit 1 % SDS homogenisiert und nach der üblichen Probenvorbereitung einer SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese unterworfen. SDS denaturiert und dissoziiert die einzelnen Polypeptidketten, so daß durch den fehlenden Kontakt untereinander keine weitere Vernetzung stattfinden kann. Die im Folgenden angegebenen Zeiten beziehen sich auf die Inkubationsdauer vor dem Zentrifugationsschritt, obwohl strenggenommen die Reaktion erst durch die Zugabe von SDS gestoppt wird.

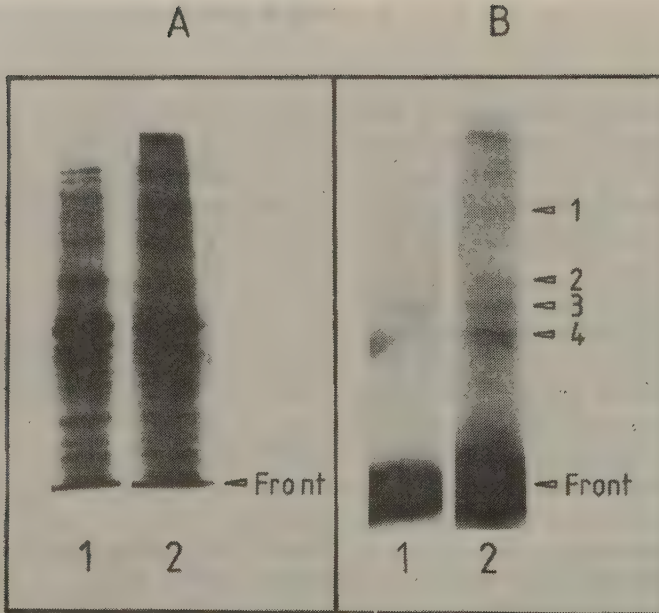


Abb. 24: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. C 2.5) 5 % Gel.

A: Coomassie-Blau Färbung; B: Autoradiogramm  
Aufgetragen wurden axonale Membranfragmente  
mit einem Proteingehalt von 80 µg.  
Bindung:  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Konzentration: 120 nM,  
Proteinkonzentration: 0,4 mg/ml.

Vernetzung: Spur 1: 15 min FFDS 0,24 mM  
(1:185 aus Stammlösung in DMSO)  
Spur 2: 15 min FFDNB 0,26 mM  
(1:185 aus Stammlösung in Ethanol)

Qualitativ ist aus diesem Experiment ein klarer Unterschied zwischen FFDS und FFDNB im Ausmaß der Markierung von Banden zu erkennen: Nach Vernetzung mit FFDS erscheint fast alle Radioaktivität in der Front, während FFDNB auch einige Polypeptidketten mit

$^{125}\text{I}$ -ATX I vernetzt. Diese sind in Abb. 24 B mit 1, 2, 3, 4 bezeichnet und weisen ein Molekulargewicht von 120 000, 90 000, 80 000 und 70 000 auf (interne Standards s.u.). ATX I läuft in diesem Gelsystem mit der Front, so daß die Radioaktivität entweder ungebundenes  $^{125}\text{I}$ -ATX I repräsentiert bzw.  $^{125}\text{I}$ -ATX I, das nur mit niedermolekularen Strukturen vernetzt ist, z.B. Phospholipiden der Membran. Letztere Möglichkeit ist nicht unwahrscheinlich; es ist gezeigt worden, daß FFDNB und auch FFDS Phospholipide mit Aminogruppen wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin miteinander vernetzen kann (128). Auch erscheint der Radioaktivitätsanteil in der Front nach Vernetzung mit FFDS geringer als nach Reaktion mit FFDNB; wäre die Front-Radioaktivität nur durch ungebundenes  $^{125}\text{I}$ -ATX I zu erklären, sollte sie in beiden Fällen gleiche Ausmaße erreichen. In diesem Experiment war die Markierung der höhermolekularen Banden durch  $^{125}\text{I}$ -ATX I nicht mit einem Überschuß an nativem ATX I inhibierbar, in einem anderen konnte jedoch spezifische Markierung gezeigt werden.

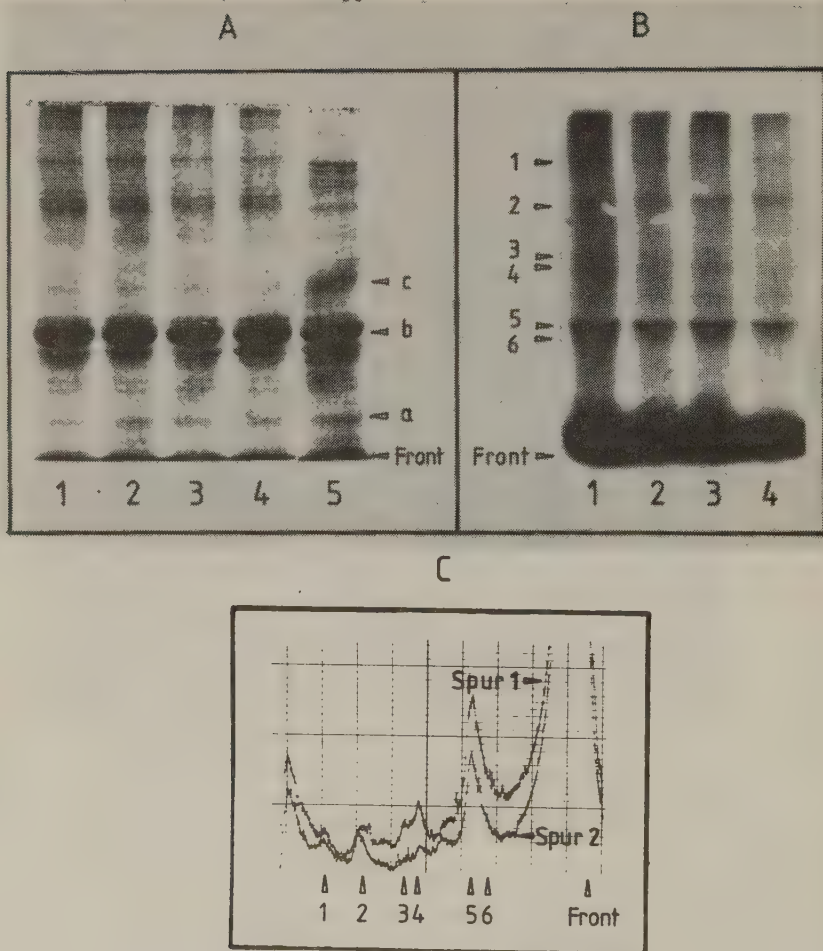


Abb. 25: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. C 2.5) 5 % Gel.

A: Coomassie-Blau Färbung; B: Autoradiogramm; C: Densitogramm zweier Spuren aus B.

Aufgetragen wurden axonale Membranfragmente mit einem Proteingehalt von 80 µg. Bindung:  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Konzentration: 110 nM, Proteinkonzentration: 0,6 mg/ml. Spur 1,3: Bindung in Abwesenheit, Spur 2,4: Bindung in Gegenwart von 15 µM ATX I. Spur 5: keine Zugabe von  $^{125}\text{I}$ -ATX I.

Vernetzung: FFDNB 0,27 mM (1:180 aus Stammlösung in Ethanol). Spur 1,2: 15 min, Spur 3,4: 45 min Vernetzung. Spur 5: keine Vernetzung.

Abb. 25 A macht deutlich, daß FFDNB nicht nur  $^{125}\text{I}$ -ATX I an Polypeptidketten der Membran vernetzen kann, sondern auch Polypeptidketten untereinander: das Bandenmuster der Membranen verändert sich nach Vernetzung, besonders im Molekulargewichtsbereich  $>100\ 000$  (vgl. Spur 5: "native" Membranen und Spur 1-4: vernetzte Membranen). Im Autoradiogramm sind verschiedene markierte Banden auszumachen, in Abb. 25 B mit 1-6 bezeichnet (Spur 1,3). Nur die Markierung der Banden 3 und 4, evtl. auch die von Bande 6, ist spezifisch, d.h. in Gegenwart eines Überschusses an nativem ATX I inhibiert (Spur 2,4).

Zur Bestimmung der Molekulargewichte: sie ist im SDS-Gel Schwankungen unterworfen, z.B. können sich je nach Konzentration des Gels unterschiedliche Werte ergeben. Um nun die Ergebnisse besser untereinander vergleichen zu können, wurden die aus verschiedenen Versuchen mit externen Standardwerten aus Eichproteinen erhaltenen Molekulargewichte für die im Text zu Abb. 15 beschriebenen drei herausragenden Banden als interne Standards gewählt. Es sind dies im Einzelnen, in Abb. 25 A mit a, b, c bezeichnet: a: (Aktin?)  $48\ 000$ ; b: (Acetylcholinesterase?)  $68\ 000$ ; c: (Na/K-ATPase?)  $90\ 000$ . Der hierdurch definierte Bereich ist zur Bestimmung der Molekulargewichte der Banden 3-6 ausreichend, wobei erhalten wurde für Bande 3:  $98\ 000$ , Bande 4:  $90\ 000$ , Bande 5:  $68\ 000$ , Bande 6:  $62\ 000$ .

Zum Vergleich seien die Molekulargewichte genannt, die im selben Experiment mit externen Standards bestimmt wurden: Bande 1:  $230\ 000$ , Bande 2:  $165\ 000$ , Bande 3:  $110\ 000$ , Bande 4:  $100\ 000$ , Bande 4:  $67\ 000$ , Bande 6:  $62\ 000$ .

Abweichungen ergeben sich also vor allem im höheren Molekulargewichtsbereich, halten sich jedoch im Rahmen der 10 %-Schwankungen, mit denen Molekulargewichtsbestimmungen im SDS-Gel generell behaftet sind.

Da angenommen werden muß, daß die Polypeptidketten in den radioaktiv markierten Banden kovalent mit einem Molekül  $^{125}\text{I-ATX I}$  verknüpft sind (Molekulargewicht ca. 5 000), ergeben sich als tatsächliche Molekulargewichte der beiden verdrängbar markierten Banden: 93 000  $\pm$  10 % bzw. 85 000  $\pm$  10 %.

Es ist auffällig, daß Bande 5 genau mit der in Abb. 25 A als b bezeichneten übereinstimmt. Dies bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß diese Polypeptidkette (Acetylcholinesterase?) mit  $^{125}\text{I-ATX I}$  markiert werden kann: sie müßte nach Vernetzung ein höheres Molekulargewicht aufweisen. Ein analoger Schluß gilt für die Banden 4/c.

#### B 1.3.3.2 Anregung durch UV-Licht

Photokatalysierte kovalente Reaktionen zwischen Makromolekülen sind schon seit längerer Zeit bekannt und wurden z.B. genutzt, um Protein-Nukleinsäuren-Wechselwirkungen zu untersuchen (126). Die Natur dieser Reaktionen wird dabei im Einzelnen nicht verstanden, jedoch ist wahrscheinlich, daß vor allem aromatische Reste bis zur Bildung eines Radikals angeregt werden und so miteinander reagieren können.

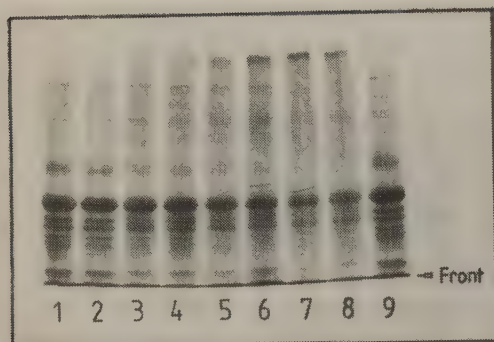
Auch bestimmte Liganden gehen nach UV-Bestrahlung kovalente Bindungen mit ihrem Rezeptorprotein ein: die ersten Untersuchungen hierzu wurden mit zyklischen Nukleotiden durchgeführt (126). Später gelang es, die Benzodiazepin-Bindungsstelle kovalent zu markieren (134, 135) und auch eine Lokalanästhetika-Bindungsstelle im AChR-Komplex konnte so identifiziert werden (91).

Da ATX I ebenfalls aromatische Aminosäurereste besitzt, war die Möglichkeit denkbar, es ebenfalls über eine UV-induzierte Reaktion mit seiner Bindungsstelle zu verknüpfen.

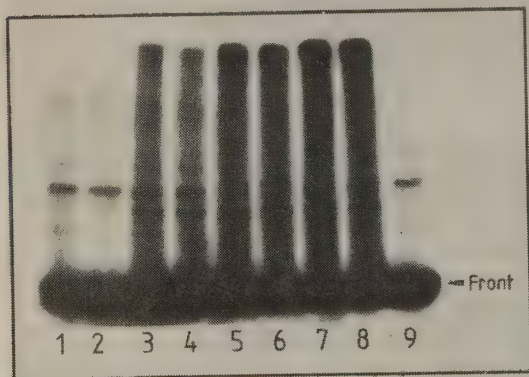
Daß dies im Prinzip mit Peptidliganden möglich ist, zeigte erst kürzlich eine Arbeit, in der  $\alpha$ -Bungarotoxin bei UV-Bestrahlung kovalent mit dem AChR-Komplex reagierte (136).

Die Versuche zur UV-Markierung wurden ganz ähnlich wie die mit bifunktionellen Liganden durchgeführt.

Nach reversibler Bindung wurden die Proben in einem nach oben geöffneten Glasgefäß aus 5 cm Entfernung bei Raumtemperatur mit einer UV-Lampe bestrahlt (Quarzlampen GmbH, Hanau, Typ 5241, 0,35 Watt). Nach der gewünschten Bestrahlungszeit erfolgte Zentrifugation und Weiterbehandlung wie beschrieben. Abb. 26 zeigt das Ergebnis eines typischen Experiments.



B



C

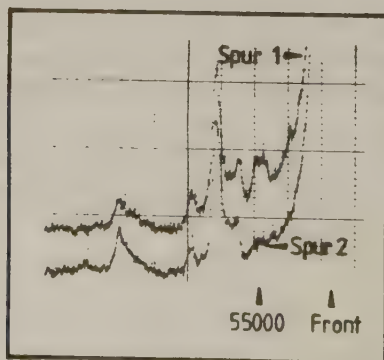


Abb. 26:

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. C 2.5) 5%-Gel.

A: Coomassie-Blau Färbung;

B: Autoradiogramm;

C: Densitogramm zweier

Spuren aus B.

Aufgetragen wurden axonale Membranfragmente mit einem Proteingehalt von 80 µg.

Bindung:  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Konzentration: 100 nM, Proteinkonzentration: 0,5 mg/ml.

Spur 1, 3, 5, 7, 9: Bindung in Abwesenheit, Spur 2, 4, 6, 8: Bindung in Anwesenheit

von 20 µM ATX I. Spur 9: zusätzlich 7,7 mM  $\text{NaN}_3$ .

Bestrahlung: Spur 1, 2: 0 min,

Spur 3, 4: 15 min, Spur 5, 6:

30 min, Spur 7, 8: 45 min,

Spur 9: 0 min.

Der Vergleich der Coomassie-Blau gefärbten Spuren untereinander macht deutlich, daß durch UV-Bestrahlung das Bandenmuster über den gesamten Molekulargewichtsbereich drastisch verändert wird. Nach 45 min Bestrahlung sind nur noch höchstens drei distinkte Banden zu erkennen, der Rest wurde wahrscheinlich zu hochmolekularen Polymeren vernetzt, die nicht mehr in das Gel wandern können (s. zunehmende Färbung am Anfang des Gels, Abb. 26 A).

Das Autoradiogramm zeigt, daß durch UV-Bestrahlung tatsächlich Radioaktivität in einzelne Banden inkorporiert wird (Spur 3-8), jedoch ist keine spezifische Markierung zu beobachten. Darüberhinaus ist Radioaktivität über die ganze Gellänge verschmiert, was darauf hinweist, daß durch die UV-Bestrahlung evtl. Konglomerate ganz verschiedenen Molekulargewichts entstehen. Alternativ wäre allerdings auch denkbar, daß durch UV-Licht  $^{125}\text{I}$ od aus  $^{125}\text{I}$ -ATX I freigesetzt wird, das dann unspezifisch mit den gesamten Membrankomponenten reagiert.

Insgesamt jedenfalls ist UV-Bestrahlung für das untersuchte System keine geeignete Methode, zumal auch andere Versuche mit kürzeren Bestrahlungszeiten zeigten, daß ein signifikanter UV-induzierter Einbau von Radioaktivität immer von einem "Verwischen" des Bandenmusters begleitet war.

Eine überraschende Tatsache war jedoch schon in vorangegangenen Experimenten aufgefallen und bestätigte sich auch in dem hier gezeigten Versuch.

In Spur 1 und 2 der Abb. 26 B ist eine wenn auch schwache, so doch deutliche Markierung von Banden auch bei unbestrahlten Proben zu beobachten. Sie ist sogar spezifisch, wie der Augenschein und das Densitogramm in Abb. 26 C zeigen: eine Bande mit dem Molekulargewicht  $50\,000 \pm 10\%$  (interner Standard, Molekulargewicht von ATX I abgezogen) taucht nach Bestrahlung in Gegenwart eines Überschusses an ATX I nicht mehr auf.

Diese Selbstmarkierung in Abwesenheit eines Vernetzungsagens ist ungewöhnlich und schwierig zu erklären (s. folgende Diskussion), eine Möglichkeit für einen Artefakt wurde aber ausgeschlossen: in den  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Proben sind immer Spuren von Lactoperoxidase, die nach der Jodierung auf der Säule nicht abgetrennt werden. Es wäre nun vorstellbar, daß hiervon eine "Umjodierung" von  $^{125}\text{I}$ -ATX I auf Polypeptidketten der Membran während der Inkubations- und Bestrahlungszeit katalysiert würde. Daß dies wahrscheinlich nicht der Fall ist, zeigt das Autoradiogramm in Spur 9: die Selbstmarkierung findet auch statt in Gegenwart von Natriumazid, einem Hemmstoff der Lactoperoxidase.

Gleichfalls kann ausgeschlossen werden, daß UV-Anteile im Labor-Kunstlicht verantwortlich sind: in Kontrollversuchen wurde die Markierung auch nach Inkubation der Proben unter Lichtausschluß beobachtet.

#### B 1.3.4 Diskussion der Ergebnisse

Die molekulare Struktur des Natriumkanals ist an anderen Systemen schon relativ gut untersucht.

Rafferty und Kollegen fanden in hochgereinigten TTX-bindenden Präparationen aus Electrophorus als Hauptkomponente ein Peptid mit dem Molekulargewicht 260 000 (137), während Catterall und Mitarbeiter zeigten, daß bei der Solubilisierung und Reinigung von Natriumkanalkomponenten aus Rattenhirnsynaptosomen zwei Polypeptidketten mit den Molekulargewichten 270 000 und 38 300 zusammen mit der Saxitoxin-Bindungsaktivität angereichert wurden (52), Peptide mit fast identischem Molekulargewicht wurden in derselben Arbeitsgruppe spezifisch durch das Photoaffinitätsderivat eines Skorpiontoxins markiert, während bei Neuroblastomazellen nur die größere Polypeptidkette das Reagenz inkorporierte (49). Dieses Peptid, von Catterall als  $\alpha$ -Untereinheit bezeichnet, scheint also ein wichtiger Bestandteil des Natriumkanalkomplexes in zumindest drei verschiedenen Systemen zu sein. Skorpiontoxine besitzen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Seeanemonentoxine, und interagieren mit ähnlichen oder identischen Bindungsstellen. Dies wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt (s. Einleitung A 1.2.1.1.3).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Peptid mit ähnlichem Molekulargewicht durch  $^{125}\text{I}$ -ATX I nicht spezifisch markiert werden.

Zwar wurde nach Vernetzung wiederholt Radioaktivität in diesem Molekulargewichtsbereich gefunden (vgl. z.B. "Bande 1" in Abb. 25 B), jedoch wurde hier keine

Inhibition durch natives ATX I beobachtet.

Eine naheliegende Erklärung für das Nichtauftreten dieser " $\alpha$ -Untereinheit" im untersuchten System wäre proteolytischer Abbau, jedoch ergab auch die Verwendung der in (49, 52) beschriebenen Proteasehemmstoffe keine anderen Ergebnisse.

Entweder ist diese Komponente also im Natriumkanalkomplex von Krebsgehnerven nicht enthalten, oder die angewendeten Methoden sind für ihre spezifische Markierung ungeeignet. Die Möglichkeit besteht durchaus, daß bei den durchgeführten Experimenten vorwiegend "nichtpolarisierbare" Vesikel verwendet wurden, an die die  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Bindung dann so niederaffin ist (s. Diskussion B 1.3.2.3), daß der spezifisch gebundene Anteil für eine erfolgreiche Markierung entweder zu gering ist, bzw. die gebundenen  $^{125}\text{I}$ -ATX I-Moleküle während der Reaktionszeit z.B. der bifunktionellen Reagenzien von der Bindungsstelle wegdiffundieren können und dann "unspezifisch" markieren. Denkbare Reaktionspartner hierfür sind außer Peptiden auch Phospholipide der Membran wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin.

Das Äquivalent zu der in Abschnitt B 1.3.3.2 beschriebenen und nicht durchgängig reproduzierbaren Stimulierung der reversiblen Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer wäre dann die in Abb. 25 gezeigte spezifische Markierung durch  $^{125}\text{I}$ -ATX I nach Reaktion mit dem bifunktionellen Reagenz 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol. Dieses Experiment war so ebenfalls nicht mehr reproduzierbar.

Jedenfalls ist die Affinitätsmarkierung mit  $^{125}\text{I}$ -ATX I wohl keine geeignete Methode, um Kanalbestandteile zu identifizieren, da Artefakte nicht sicher auszuschließen sind.

Dies zeigt auch die schwache aber deutliche "spezifische Selbstmarkierung" in Abwesenheit eines Vernetzungsgagens. Das Molekulargewicht der hierbei markierten Polypeptidkette wurde in der vorliegenden Arbeit mit 50 000 ermittelt; dies korreliert auffällig mit dem Wert 53 000, der in ersten Experimenten mit einem Nitroazidoderivat von  $^{125}\text{I}$ -ATX I erhalten wurde (43, 45). Eventuell war in diesen Versuchen also gar nicht die aktivierbare Gruppe des Photoaffinitätsreagens für den Einbau verantwortlich, sondern ein ähnlicher Mechanismus wie der hier beschriebene, dessen Natur gegenwärtig nicht erklärt werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Hautwachstumsfaktor ("epidermal growth factor", EGF) erhalten: zwei Arbeitsgruppen zeigten unabhängig voneinander den kovalenten Einbau des  $^{125}\text{Jod}$ -markierten Peptidliganden in seinen Rezeptor in Abwesenheit eines Vernetzungsgagens. Über den Mechanismus dieser Reaktion ist nichts bekannt, eine Artefaktmöglichkeit, nämlich der Transfer von  $^{125}\text{I}$  von EGF auf den Rezeptor, wurde durch Kontrollversuche jedoch ausgeschlossen (138, 139).

In diesem Fall ist eine physiologische Relevanz des Vorgangs denkbar: kovalent gebundene EGF-Moleküle würden mit ihrem Rezeptor internalisiert und könnten dann ihre Primär- oder auch Sekundäreffekte ausüben.

Andererseits erscheint es schwer erklärbar, weshalb Natriumkanalkomponenten ihr "eigenes" Toxin kovalent binden sollten. Hier müßte schon eine katalytische Fähigkeit des Toxinmoleküls angenommen werden, solche Bindungen einzugehen. Über solche Eigenschaften wurde bisher nichts berichtet, jedoch könnte dadurch auch erklärt werden, weshalb ATX I und II am Krebsnerven irreversibel wirken, d.h. ihr aktionspotentialverlängernder Effekt auch nach mehrmaligen Waschen bestehen bleibt (37).

Ein Artefakt ist deshalb nicht die einzige Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete "Selbstmarkierung".

B 2                    Untersuchungen am Ionenkanal des AChR-Komplexes

B 2.1                Spannungsabhängige Akkumulierung von  $^3\text{H-TPMP}^+$

In B 1.3.2.2 wurde das lipophile Kation Methyltriphenylphosphonium ( $\text{TPMP}^+$ ) als "Potentialsensor" verwendet. Diese Methode, die von Kaback entwickelt wurde (z.B. 140, 141) beruht auf der Akkumulierung des positiv geladenen Ions in membranumschlossene Kompartimente, wobei der Grad der Anreicherung von der Höhe eines (innen negativen) Membranpotentials abhängt. Auch elektrophysiologisch nicht zugängliche Systeme wie (kleine) Zellen, subzelluläre Fraktionen wie Synaptosomen und insbesondere Membranvesikel können so hinsichtlich ihres Membranpotentials untersucht werden.

Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war zunächst, die Brauchbarkeit von TPMP<sup>+</sup> an einer Präparation AChR-reicher Membranvesikel aus den elektrischen Organ von Torpedo marmorata zu testen. Bei der in unserem Labor vorgenommenen Aufarbeitung (s. C 2.3) wird das Gewebe zunächst in einem Medium mit hoher Salzkonzentration homogenisiert, und nach verschiedenen Wasch- und Zentrifugationsschritten wird ein rohes Membranhomogenisat einer Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten unterworfen. AChR-reiche Vesikel aus postsynaptischen Membranen werden dabei bei mittlerer Dichte angereichert (ca. 40 % Sucrose) und können so von anderen Fraktionen, etwa mit hoher Acetylcholinesterase- oder ATPase-Aktivität getrennt werden. Die erhaltene Vesikelpopulation ist also zum einen sehr homogen zumindest bezüglich ihres Proteingehalts (mehr als 80 % des Gesamtproteins besteht aus AChR), zum anderen ist die Präparationsmethode in unserem Labor weitgehend standardisiert und reproduzierbar.

Für die ins Auge gefaßten Untersuchungen war vor allem eine Eigenschaft dieser rezeptorreichen Membranvesikel wertvoll: sie sind chemisch erregbar, das heißt die Öffnung des rezeptorgekoppelten Ionenkanals kann durch cholinerge Agonisten stimuliert werden. Es sollte also möglich sein, ein vorhandenes Membranpotential gezielt zu beeinflussen, und diese Veränderungen sollten auch die Akkumulierung von TPMP<sup>+</sup> beeinflussen.

Zunächst jedoch wurde nach der in B 1.3.2.2 beschriebenen Methode versucht, ein Membranpotential zu erzeugen: Vesikel, die über Nacht in K<sup>+</sup>-Ringer equilibriert waren, wurden in Medien verdünnt, in denen

$K^+$ - durch  $Na^+$ -Ionen ersetzt waren. Da wie bei der Axonmembran auch bei der Torpedo-Elektroplaquemembran das Ruhepotential im Wesentlichen vom  $K^+$ -Konzentrationsgradienten herrührt (69), sie also auch in Abwesenheit cholinergischer Agonisten eine gewisse Kaliumpermeabilität aufweist, sollte bei der Verdünnung aus  $K^+$ - in  $Na^+$ -Ringer ein Potential entstehen.

In Abb. 27 wird gezeigt, daß dies zumindest qualitativ durch die Akkumulation von  $^3H$ -TPMP<sup>+</sup> nachgewiesen werden kann, wobei zur Messung hier und im Folgenden der in B 1.3.2.1 beschriebene Filtrationstest leicht modifiziert (s. C 2.4.4) eingesetzt wurde.

cpm / Filter

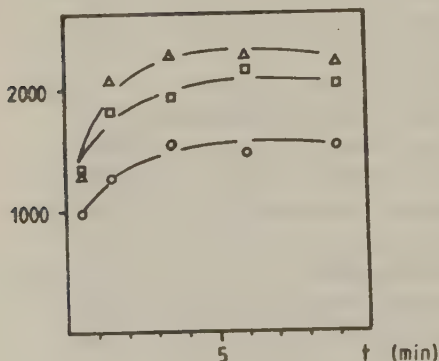


Abb. 27:

Akkumulation von  $^3H$ -TPMP<sup>+</sup> in AChR-reiche Membranfragmente

Proteinkonzentration: 0,65 mg/ml. [ $^3H$ -TPMP<sup>+</sup>]: 50 nM. Membranen waren in  $K^+$ -Ringer equilibriert und wurden verdünnt in Ringer mit verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen, wobei jeweils die Alkaliionenkonzentration mit NaCl auf 165 mM gehalten wurde. Die  $K^+$ -Konzentrationen betrugen (○) 160 mM; (□) 80 mM; (△) 3 mM. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100 µl wie in C 2.4.4 beschrieben filtriert. Der Filterleerwert (Filtration ohne Vesikel) betrug ca. 200 cpm.

Die  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup>-Akkumulierung ist also nach ungefähr 5 min abgeschlossen und tatsächlich abhängig von der K<sup>+</sup>-Konzentration des Verdünnungsmediums.

Eine quantitative Auswertung dieser Versuche ist jedoch nicht ohne weiteres möglich: die Akkumulierung nach Verdünnung in K<sup>+</sup>-Ringer, also ohne Membranpotential, ist nur vom Volumen des Vesikelinneren abhängig. In diesem Versuch wurden pro 65 µg Protein ca. 1300 cpm auf dem Filter zurückgehalten (Leerwert abgezogen) oder 20 000 cpm/mg. Die Radioaktivitätskonzentration der Inkubationslösung vor Verdünnung war 1150 cpm/µl, so daß sich ein Vesikelvolumen von 17,4 µl/mg Protein ergibt. Dieser Wert ist jedoch sicher bedeutend höher als der tatsächliche: für andere subzelluläre Präparationen wie Escherichia coli-Membranvesikel oder Synaptosomen wurden 2,2 µl/mg bzw. 3,6 µl/mg angegeben (140, 141), bei AChR-reichen Membranvesikeln aus Torpedo liegt er aufgrund des hohen Proteingehalts der Membran noch niedriger. Hazelbauer und Changeux erhielten um 0,5 µl/mg (142), während aus  $^{22}\text{Na}^+$ -Effluxversuchen mit unserer Vesikelpräparation ein Wert von höchstens 1 µl/mg hervorgeht (s. B 2.2.4).

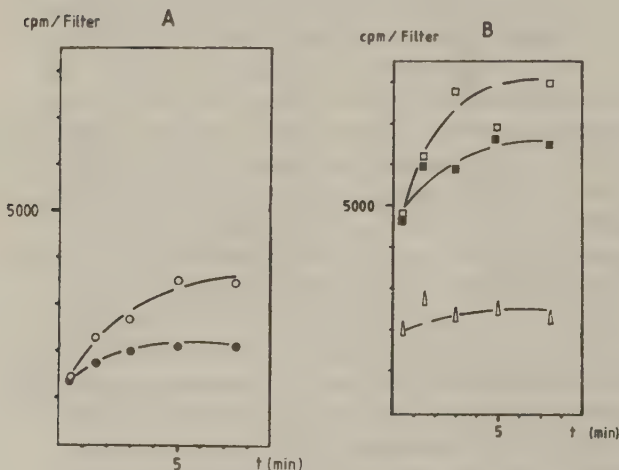
Schon diese Überlegungen machten wahrscheinlich, daß die Akkumulierung von  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup> in rezeptorreiche Membranvesikel nicht nur potentialabhängig erfolgt, sondern daß ein bedeutender Anteil der Ionen auf andere Weise an die Vesikel gebunden wird.

Im Folgenden wird denn auch der Begriff " $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup>-Akkumulierung" meist durch " $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup>-Bindung" ersetzt.

## B 2.2 $^3\text{H-TPMP}^+$ als Ligand des Ionenkanals

### B 2.2.1 Einfluß cholinergischer Liganden auf die $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung

Wie oben schon erwähnt, sollte es möglich sein, ein vorhandenes Potential durch die Einwirkung cholinergischer Agonisten zu erniedrigen, daß heißt die Membran zu depolarisieren. Erwartungsgemäß müßte dann die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung ebenfalls vermindert sein. Ein entsprechendes Experiment ist in Abb. 28 gezeigt.



**Abb. 28:** Bindung von  $^3\text{H-TPMP}^+$  an AChR-reiche Membranfragmente

Proteinkonzentration: 0,26 mg/ml.

[ $^3\text{H-TPMP}^+$ ]: 130 nM.

A) Die Membransuspension wurde in entweder K<sup>+</sup>-Ringer (-●-) oder Na<sup>+</sup>-Ringer (-○-) verdünnt.

B) Das Verdünnungsmedium enthielt 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin. Die Membransuspension wurde in entweder K<sup>+</sup>-Ringer (-■-) oder Na<sup>+</sup>-Ringer (-□-) verdünnt. (-Δ-): Die Membransuspension wurde vor Verdünnung in Na<sup>+</sup>-Ringer 10 min bei Raumtemperatur mit 10  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin inkubiert.

In Abb. 28 A wird die Potentialabhängigkeit der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung reproduziert. Die Verdünnung in Gegenwart des Agonisten Carbamylcholin ergibt nun nicht etwa niedrigere Werte, die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung ist sogar stimuliert, unabhängig davon, ob in  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt wurde. Dabei erfolgt die Gesamtbindung mit einer biphasischen Kinetik: einem ersten, schnellen Schritt folgt ein langsamer, der in etwa 5 min zum Gleichgewicht führt. Es erscheint plausibel anzunehmen, daß der erste Schritt einer schnellen Bindungsreaktion, der zweite der eigentlichen Akkumulierung in die Membranvesikel entspricht. Genauere Messungen zu diesem Problem können jedoch mit dem Filtrationstest wegen seines zu geringen zeitlichen Auflösungsvermögens nicht vorgenommen werden.

Auch in Gegenwart von Carbamylcholin erreicht die Gesamtbindung in Abhängigkeit vom Verdünnungsmedium unterschiedliche Ausmaße, Carbamylcholin scheint also die Vesikelmembran nicht dauerhaft zu depolarisieren. Diese Tatsache ist zunächst verwirrend, könnte jedoch damit erklärt werden, daß die kurzzeitige Öffnung der rezeptorgekoppelten Ionenkanäle nicht ausreicht, um die Ionenkonzentrationsgradienten vollständig auszugleichen; die mit der darauffolgenden Desensitivierung der AChR-Komplexe (s. A 1.2.2.1) einhergehende dauerhafte Blockierung der Kanäle könnte dann sogar zu einer Stabilisierung eines eventuell vorhandenen Restpotentials führen.

Jedenfalls ist die Stimulierung der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung ein spezifischer Effekt von Carbamylcholin auf den AChR (alternativ wäre ja auch ein unspezifisches Einwirken z.B. auf die Vesikelmembran denkbar): Blockierung der cholinergen Bindungsstelle durch  $\alpha$ -Bungarotoxin verhindert den Carbamylcholin-Effekt, dieser wird also durch die Interaktion von Carbamyl-

cholin mit eben dieser Bindungsstelle vermittelt. So wird, wie in einem Kontrollexperiment gezeigt, auch die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung in axonale Membranfragmente aus Krebsnerven, die keinen nikotinischen AChR besitzen, durch Carbamylcholin nicht stimuliert, während mit Membranvesikeln aus dem elektrischen Organ von Torpedo californica qualitativ gleiche Ergebnisse erzielt wurden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für den Mechanismus der Stimulierung der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung durch Carbamylcholin wäre, daß  $^3\text{H-TPMP}^+$  an die aktive Konformation des AChR-Komplexes mit höherer Affinität bindet als an die ruhende. Jedoch konnte gezeigt werden, daß auch nach Inaktivierung des AChR durch Desensitivierung die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung erhöht bleibt, die bevorzugte Konformation also nicht der aktive Zustand des AChR ist.

cpm / Filter

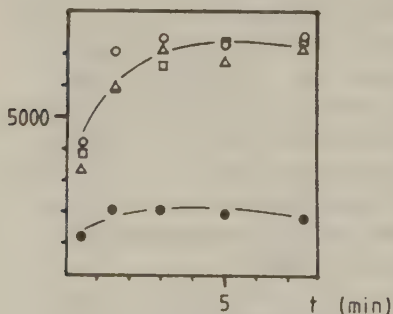


Abb. 29:

$^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung nach Desensitivierung

Proteinkonzentration: 0,36 mg/ml. [ $^3\text{H-TPMP}^+$ ]: 50 nM. Membranen waren in  $\text{Na}^+$ -Ringer equilibriert und wurden in  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt. (-●-): keine weiteren Zusätze; (○-): offene Symbole; (-○-): Bindung in Gegenwart von 10 µM Carbamylcholin; (-Δ-, -□-): Membranen wurden 15 min vor Verdünnung bei Raumtemperatur mit 10 µM bzw. 100 µM Carbamylcholin inkubiert.

Auch die Ergebnisse anderer Experimente machen den oben vorgeschlagenen Mechanismus unwahrscheinlich:

Stimulierung der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung wird nicht nur in Gegenwart des Agonisten Carbamylcholin beobachtet. Auch eine Anzahl anderer Effektoren beeinflusst das  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindungsverhalten an rezeptorreiche Membranvesikel.

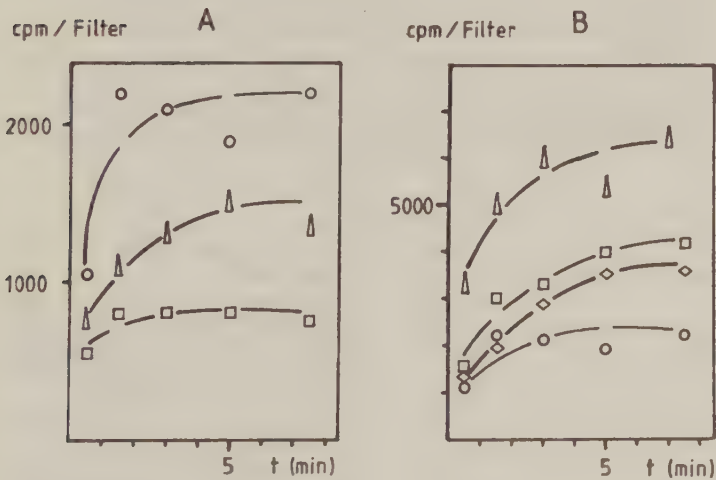


Abb. 30: Einfluß cholinergischer Effektoren auf die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung

Proteinkonzentration; 0,26 mg/ml.

[ $^3\text{H-TPMP}^+$ ]: 90 nM. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert.

A) Inhibitorische Effektoren.

(-o-): Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer; in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin (- $\Delta$ -) oder 100  $\mu\text{M}$  Tetracain (- $\square$ -).

B) Stimulierende Effektoren. (-o-): Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer; in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Decamethonium (- $\diamond$ -); 100  $\mu\text{M}$  d-Tubocurarin (- $\square$ -); 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin (- $\Delta$ -).

Nicht nur cholinerge Agonisten wie Carbamylcholin und Acetylcholin also stimulieren die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung, auch der Antagonist d-Tubocurarin wirkt ähnlich, wenn auch schwächer. Nur der Antagonist  $\alpha$ -Bungarotoxin sowie insbesondere das Lokalanästhetikum Tetracain inhibieren. In ähnlichen Versuchen wurde zudem eine schwach stimulierende Wirkung des Antagonisten Flaxedil festgestellt, während das Lokalanästhetikum Procain in geringem Ausmaß inhibierte (Konzentrationen jeweils 100  $\mu\text{M}$ ).

In einer Dosiswirkungskurve wurde eine maximal stimulierende Carbamylcholinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessen.

% Bindung

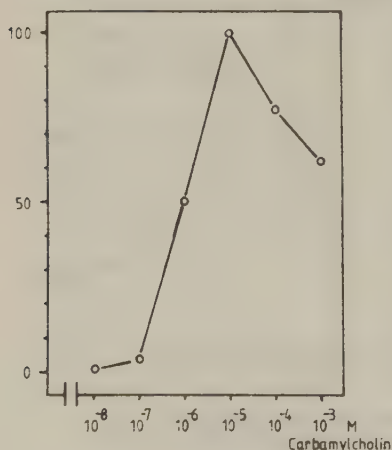


Abb. 31:

Dosiswirkungskurve für Carbamylcholin

Proteinkonzentration: 0,84 mg/ml.  
 $[^3\text{H-TPMP}^+]$ : 100 nM. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert. Aufgetragen wurden die Plateauwerte der zeitabhängigen  $^3\text{H-TPMP}$ -Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer in Gegenwart der angegebenen Carbamylcholin-Konzentrationen. 0 % Bindung: Bindung in Abwesenheit und 100 % Bindung: Bindung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin.

Höhere Konzentrationen als 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin inhibieren; dies könnte von einer direkten Kompetition um  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindungsstellen herrühren und widerspricht ebenfalls der Hypothese von der aktiven Konformation

des AChR als  $^3\text{H-TPMP}^+$ -bindende: Dosiswirkungskurven für den Ionenfluß aus rezeptorreichen Membranvesikeln zeigen, daß ein maximaler Ausfluß erst durch millimolare Konzentrationen von Agonisten erreicht wird (74).

#### B 2.2.2 Spezifische Bindung von $^3\text{H-TPMP}^+$

In B 1.2.1 wurde erwähnt, daß ein Kriterium für die Signifikanz der Bindung eines radioaktiv markierten Liganden an biologisches Material seine Verdrängbarkeit durch gleichartige unmarkierte Liganden ist; auch die  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung an rezeptorreiche Membranvesikel ist in diesem Sinne spezifisch, daß heißt durch unmarkiertes TPMP<sup>+</sup> verdrängbar.

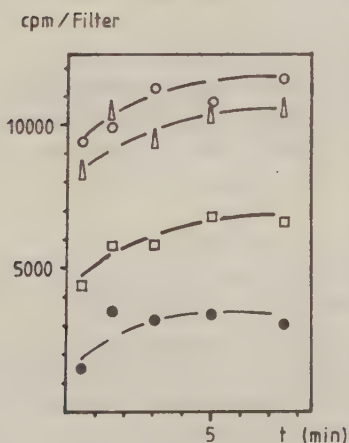


Abb. 32:

Verdrängung von  $^3\text{H-TPMP}^+$  durch unmarkiertes TPMP<sup>+</sup>

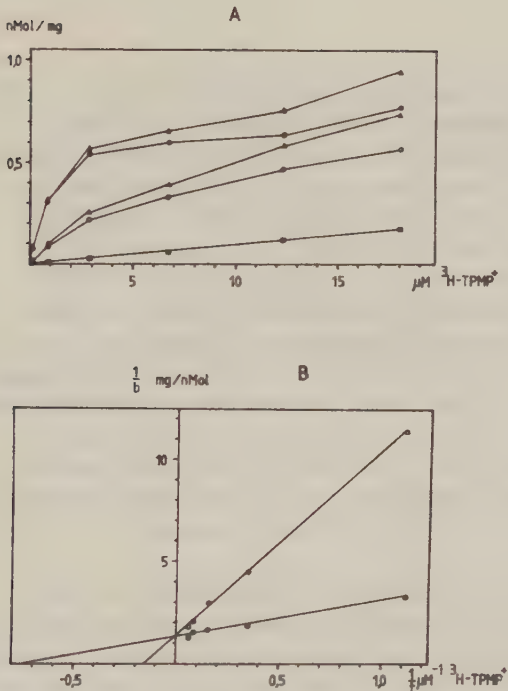
Proteinkonzentration: 0,84 mg/ml [ $^3\text{H-TPMP}^+$ ]: 70 nM. Membranen waren in  $\text{K}^+$ -Ringer equilibriert. (-●-): Bindung nach Verdünnung in  $\text{Na}^+$ -Ringer. Offene Symbole: Bindung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin; (-o-): ohne weitere Zusätze; (-Δ-): in Gegenwart eines zehnfachen und (-□-): in Gegenwart eines hundertfachen Überschusses an unmarkiertem TPMP<sup>+</sup>.

In diesem Versuch war die höchste Konzentration an unmarkiertem TPMP<sup>+</sup> 7  $\mu\text{M}$ , in Gegenwart von 5 mM TPMP<sup>+</sup> beträgt die Bindung nur noch etwa 2 % des Maximalwertes (vgl. Abb. 33). Auch dieser Versuch zeigt, daß

von der Gesamtbindung die spannungsabhängige Akkumulierung nur einen geringen Teil ausmacht: sie sollte im gewählten Bereich konzentrationsunabhängig sein. Erst bei millimolaren  $\text{TPMP}^+$ -Konzentrationen könnte tatsächlich auch spannungsabhängige  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Akkumulierung beeinträchtigt werden, da durch die Anreicherung der Kationen im Vesikelinneren dann auch das Membranpotential verringert würde. Mikromolare  $\text{TPMP}^+$ -Konzentrationen verändern es jedoch nicht merklich, da der Konzentrationsgradient an  $\text{K}^+$ -Ionen immerhin 165 mM:16,5 mM beträgt.

In einem weiteren Versuch wurde die Affinität der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung bestimmt. Da  $^3\text{H-TPMP}^+$  und  $\text{TPMP}^+$  chemisch identische Verbindungen sind und sich sicher nicht in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden, wurden die gewünschten Konzentrationen durch Verdünnen von  $^3\text{H-TPMP}^+$  mit  $\text{TPMP}^+$  hergestellt. Unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines hohen Überschusses an  $\text{TPMP}^+$  (5 mM) ermittelt (Abb. 33).

Die Analyse der Bindungsdaten (s. C 2.4.1) zeigt, daß Carbamylcholin die Affinität der  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung um das ungefähr Zehnfache erhöht: die  $K_D$ -Werte betragen 13  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit und 1,5  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin. Die Anzahl der Bindungsstellen bleibt jedoch gleich: die maximal gebundene Menge an  $^3\text{H-TPMP}^+$  beträgt in beiden Fällen 0,8 nMol/mg. Dies ist ungefähr die Hälfte des Wertes, der in einer ähnlichen Präparation mit  $^3\text{H-Acetylcholin}$  ( $^3\text{H-ACh}$ ) erreicht wurde (s. B 2.2.3).



**Abb. 33:** Bindung von  $^3\text{H}$ -TPMP $^+$  an AChR-reiche Membranfragmente

Proteinkonzentration: 0,23 mg/ml. Membranen waren in Na $^+$ -Ringer equilibriert. A) Direkte Auftragung der Bindungsdaten. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus zwei Bestimmungen 5 min und 5,5 min nach Verdünnung in Na $^+$ -Ringer. Geschlossene Symbole: Bindung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin. Offene Symbole: unstimulierte Bindung, keine weiteren Zusätze. ( $-\square-$ ): unspezifische Bindung in Gegenwart von 5 mM TPMP $^+$ , erreicht dieselben Werte auch in Abwesenheit von Carbamylcholin. ( $-\Delta-$ ,  $-\bullet-$ ): Gesamtbindung und ( $-o-$ ,  $-o-$ ): spezifische Bindung als Differenz von Gesamtbindung und unspezifischer Bindung. B) Doppelt reziproke Auftragung der Werte für spezifische Bindung. ( $-o-$ ): Bindung in Abwesenheit und ( $-\bullet-$ ): Bindung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin. Die doppelt reziproken Werte der Bindung bei der niedrigsten  $^3\text{H}$ -TPMP $^+$ -Konzentration wurden nicht aufgetragen, um die Skalierung übersichtlich gestalten zu können.

Da pro AChR-Komplex zwei Acetylcholinmoleküle gebunden werden können (74, 82), bedeutet dies für die TPMP<sup>+</sup>-Bindung an den Rezeptor eine 1:1 Stöchiometrie. Diese Versuche wurden mit einer Membransuspension aus Fraktionen eines relativ breiten Bereiches des in der Präparation verwendeten Sucrosegradienten (s. C 2.3) durchgeführt. Das erklärt die relativ niedrige spezifische Bindungsaktivität: in einer 100 % reinen Rezeptorpräparation entsprächen 1 mg Protein bei einem Molekulargewicht von 270 000 einer Menge von 3,7 nMol. In der verwendeten Präparation waren also nur etwa 22 % des Proteins intakter TPMP<sup>+</sup>- und ACh-bindender AChR, während der entsprechende Wert in den reinsten Fraktionen bis zu 80 % betragen kann.

Ein weiteres Ansteigen der spezifischen <sup>3</sup>H-TPMP<sup>+</sup>-Bindung bei Konzentrationen über 15 µM wurde auch in Wiederholungsexperimenten beobachtet und reflektiert wahrscheinlich die Existenz weiterer Bindungsstellen mit niedriger Affinität, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurden.

#### B 2.2.3 TPMP<sup>+</sup> und <sup>3</sup>H-ACh-Bindung

In Experimenten zur <sup>3</sup>H-ACh-Bindung wurde die Wechselwirkung von TPMP<sup>+</sup> mit der cholinergen Bindungsstelle untersucht. Hierzu wurde durch Gleichgewichtszentrifugation (s. C 2.4.5) die <sup>3</sup>H-ACh-Bindung an rezeptorreiche Membranfragmente in Gegenwart verschiedener TPMP<sup>+</sup>-Konzentrationen gemessen. Unspezifische Bindung brauchte in diesem Versuch nicht separat bestimmt zu werden, sie ist mit <sup>3</sup>H-ACh und rezeptorreichen Membranfragmenten nicht messbar.

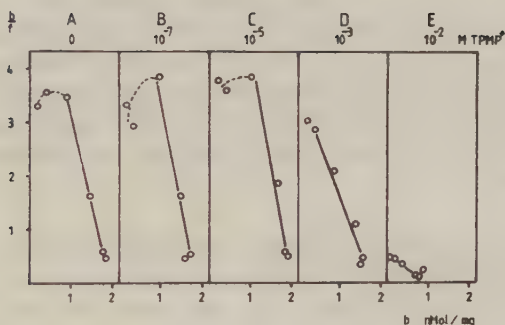


Abb. 34:  $^3\text{H}$ -ACh-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente. Auftragung nach Scatchard.

Proteinkonzentration: 0,14 mg/ml. Die  $^3\text{H}$ -ACh-Konzentration variierte von 0,3  $\mu\text{M}$  bis 7,1  $\mu\text{M}$ . Bindung wurde in  $\text{Na}^+$ -Ringer gemessen. A) keine weiteren Zusätze; B-E) Bindung in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an TPMP<sup>+</sup>.  $^3\text{H}$ -ACh und TPMP<sup>+</sup> wurden gleichzeitig zugegeben.

TPMP<sup>+</sup> in Konzentrationen bis  $10^{-5}$  M beeinflusst die  $^3\text{H}$ -ACh-Bindung nicht. Als  $K_D$ -Wert wurde 30 nM berechnet, die maximal gebundene Menge an  $^3\text{H}$ -ACh beträgt 2 nMol/mg (zur Auswertung des Scatchard-Diagramms s. C 2.4.1). In Gegenwart von  $10^{-3}$  M TPMP<sup>+</sup> erscheint die Affinität für  $^3\text{H}$ -ACh leicht reduziert, während drastische Effekte erst mit  $10^{-2}$  M TPMP<sup>+</sup> erzielt werden: die  $K_D$  wird um das Zehnfache erhöht, die Anzahl der Bindungsstellen nimmt um 50 % ab. Es besteht die Möglichkeit, daß TPMP<sup>+</sup> als lipophiles Ion in diesen hohen Konzentrationen detergensähnliche Wirkungen ausübt; Detergentien jedoch können die Bindungs-

eigenschaften des AChR erheblich verändern (74). In Abb. 34 A-C läßt sich aus der Scatchard-Auftragung eventuell auf positive Kooperativität der  $^3\text{H}$ -ACh-Bindung schließen (gestrichelter Teil der Kurve), die durch höhere Konzentrationen an  $\text{TPMP}^+$  beseitigt wird (Abb. 34 D-E), dies sei jedoch nur als Möglichkeit angedeutet.

Als Ergebnis dieses Experiments jedenfalls läßt sich festhalten:  $\text{TPMP}^+$  in Konzentrationen bis  $10^{-5}$  M übt keinen meßbaren Einfluß auf die  $^3\text{H}$ -ACh-Bindung aus. Die Bindungsstelle, an die  $\text{TPMP}^+$  in diesen Konzentrationen saturierbar und spezifisch bindet, kann deshalb nicht die cholinerge Bindungsstelle sein.

#### B 2.2.4 $\text{TPMP}^+$ blockiert $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux aus AChR-reichen Membranvesikeln

Außer der Bindungsstelle für cholinerge Liganden besitzt der AChR-Komplex natürlich noch eine weitere funktionelle Einheit: den Ionenkanal. Mit rezeptorreichen Membranvesikeln läßt sich auch diese Funktion messen. Hierzu werden Vesikel in  $\text{Na}^+$ -Ringer mit Spuren Mengen von  $^{22}\text{Na}^+$  über Nacht inkubiert. Nach Verdünnung in isotonischen, nicht radioaktiven  $\text{Na}^+$ -Ringer werden Aliquots der Suspension filtriert und die Menge an in den Vesikeln auf dem Filter zurückgehaltenem  $^{22}\text{Na}^+$  durch Radioaktivitätsmessung bestimmt (zur Methode s. C 2.6). Mit den laborüblichen Präparationen wird meist ein gewisser Leckstrom gemessen; wird die Verdünnung jedoch in Gegenwart von Carbamylcholin vorgenommen, ist der  $^{22}\text{Na}^+$ -Ausfluß (im Folgenden auch als Efflux bezeichnet) stark stimuliert, um dann nach wenigen Sekunden ebenfalls die Ausmaße des Leckstroms

anzunehmen. Die genaue Kinetik des stimulierten Ausflusses ist mit dem Filtrationstest nicht zu messen, hierzu ist sein Zeitauflösungsvermögen zu gering. Die Methode war aber gut geeignet, um eine partielle oder vollständige Blockierung der Ionenkanalfunktion durch  $\text{TPMP}^+$  nachzuweisen.

cpm / Filter

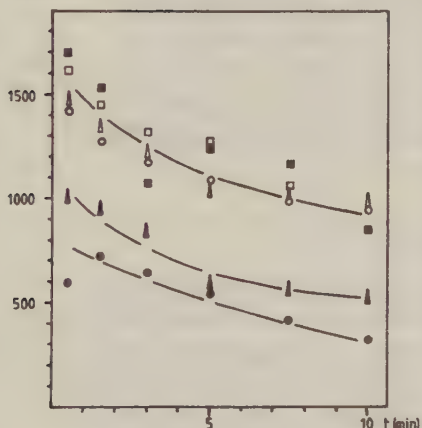


Abb. 35:

Einfluß von  $\text{TPMP}^+$  auf  $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux aus AChR-reichen Membranfragmenten

Proteinkonzentration vor Verdünnung: 6 mg/ml. Offene Symbole: Leckstrom; geschlossene Symbole: Efflux in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  Carbamylcholin. (-○-, -●-): Kontrolle ohne  $\text{TPMP}^+$ ; (-△-, -▲-): Efflux in Gegenwart von  $0,1 \text{ mM}$   $\text{TPMP}^+$  und (-□-, -■-): Efflux in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$   $\text{TPMP}^+$  in Verdünnungsmedium. Messung wie in C 2.6 beschrieben.

Die Carbamylcholin-Stimulierung des  $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux wurde also durch  $0,1 \text{ mM}$   $\text{TPMP}^+$  leicht reduziert und durch  $1 \text{ mM}$   $\text{TPMP}^+$  vollständig blockiert. Diese  $\text{TPMP}^+$ -Konzentrationen erscheinen zunächst etwas hoch, da die spezifische  $\text{TPMP}^+$ -Bindungsstelle ja schon bei  $0,01 \text{ mM}$   $\text{TPMP}^+$  saturiert ist. Es ist bei diesem Experiment jedoch zu beachten, daß die Membransuspension nicht mit  $\text{TPMP}^+$  vorinkubiert wurde. Um den Efflux vollständig zu blockieren, müssen also nach der Verdünnung so gut wie alle AChR-Komplexe mit  $\text{TPMP}^+$  besetzt sein, bevor durch die Carbamylcholin-Bindung der Ionenkanal ge-

öffnet wird: dies ist die Erklärung für die Notwendigkeit eines Überschusses an  $\text{TPMP}^+$  zur vollständigen Blockade. Die Tatsache, daß dieses Experiment überhaupt gelingt, zeigt wieder, daß die  $\text{TPMP}^+$ -Bindung im Gegensatz zur Akkumulierung mit einer Kinetik erfolgt, die mindestens so "schnell" ist wie die der Carbamylcholin-Bindung bzw. Rezeptor-Aktivierung.

Abb. 36 zeigt, daß nach Vorinkubation mit  $\text{TPMP}^+$  schon eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  ausreicht, um den Efflux vollständig zu blockieren.

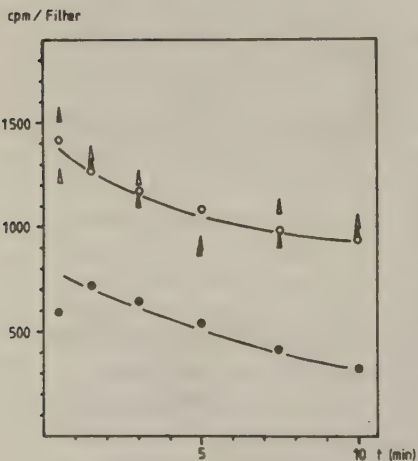


Abb. 36:

Einfluß der Vorinkubierung mit  $\text{TPMP}^+$  auf  $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux aus AChR-reichen Membranfragmenten

Proteinkonzentration vor Verdünnung:  $6 \text{ mg/ml}$ . Offene Symbole: Leckstrom; geschlossene Symbole: Efflux in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  Carbamylcholin. (-○-, -●-): Kontrolle, wie in Abb. 35; (-Δ-, -▲-): vor Verdünnung wurde die Membransuspension 10 min bei Zimmertemperatur mit  $10 \mu\text{M}$   $\text{TPMP}^+$  inkubiert, auch das Verdünnungsmedium enthielt  $10 \mu\text{M}$   $\text{TPMP}^+$ .

Aus diesen Versuchen läßt sich übrigens auch das Vesikelvolumen der Membranpräparation abschätzen. Insgesamt enthalten die Vesikel höchstens soviel

cpm, wie der Differenz von Anfangswert und Filter-leerwert entspricht. Dies ist ein oberer Wert für die Radioaktivitätskonzentration in den Vesikeln vor Verdünnung, da in ihn auch z.B. unspezifisch an die Membran gebundene oder sonstwie auf dem Filter zurückgehaltene cpm eingehen. Im obigen Versuch waren dies ca. 1300 cpm. Da 43 µg filtriert wurden, ergibt das pro mg 30 000 cpm. Vor Verdünnung wurde als Gesamtradioaktivitätskonzentration (die der Radioaktivitätskonzentration in den Vesikeln entspricht) ein Wert von 30 000 cpm/µl bestimmt. Das innere Volumen der Vesikel beträgt also 1 µl/mg Protein (s. auch B 2.1).

#### B 2.2.5 TPMP<sup>+</sup> und Lokalanästhetika

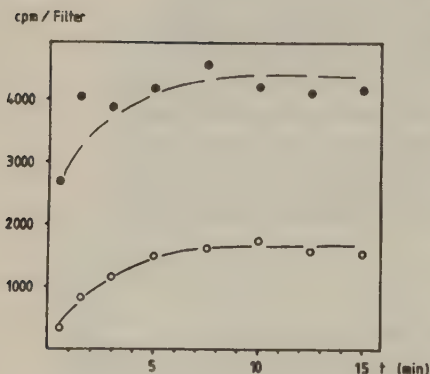
Lokalanästhetika blockieren den Ionenkanal des AChR-Komplexes. Aus verschiedenen Untersuchungen wurde geschlossen, daß ihr Wirkungsmechanismus auf ihrer Bindung an den oder in die Nähe des Kanals beruht (s. A 1.2.2.3). Mit einer Reihe von radioaktiv markierten Lokalanästhetika wurden Bindungsstudien unternommen, wobei insbesondere Phencyclidin ((1-Phencyclohexyl) piperidin; PCP) als Kanalligand vorgeschlagen wurde (104). PCP ist ein Halluzinogen, wirkt jedoch in elektrophysiologischen und biochemischen Versuchen wie ein typisches Lokalanästhetikum. Interessanterweise wird seine Bindung, wie auch die anderer Lokalanästhetika, ebenfalls durch cholinerge Liganden stimuliert (104). Da radioaktiv markiertes PCP kommerziell erhältlich ist, lag es nahe zu prüfen, ob eine Kompetition um dieselbe Bindungsstelle zwischen TPMP<sup>+</sup> und <sup>3</sup>H-PCP vorliegt.

Zunächst jedoch wurde die Stimulierung der  $^3\text{H}$ -PCP-Bindung durch Carbamylcholin mit unserer Präparation reproduziert. Zur Messung diente die auch für  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup> verwendete Filtrationsmethode (s. C 2.4.4).

Abb. 37:

$^3\text{H}$ -PCP-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente

Proteinkonzentration: 0,8 mg/ml  
[ $^3\text{H}$ -PCP]: 23 nM. Membranen waren in Na<sup>+</sup>-Ringer equilibriert und wurden in Na<sup>+</sup>-Ringer verdünnt.  
(-o-): Bindung in Abwesenheit und (-●-): Bindung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin.



Zur Messung der Kompetition wurde  $^3\text{H}$ -PCP-Bindung in Gegenwart verschiedener TPMP<sup>+</sup>-Konzentration bestimmt (Abb. 38).

TPMP<sup>+</sup> verhindert also in Gegenwart und Abwesenheit von Carbamylcholin die Bindung von  $^3\text{H}$ -PCP: spezifisch gebundenes  $^3\text{H}$ -PCP wird durch TPMP<sup>+</sup> verdrängt. Die Werte für halbmaximale Verdrängung (2  $\mu\text{M}$  in Gegenwart und 10  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit von Carbamylcholin) stimmen hierbei gut mit den im direkten Bindungstest ermittelten Dissoziationskonstanten für die  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup>-

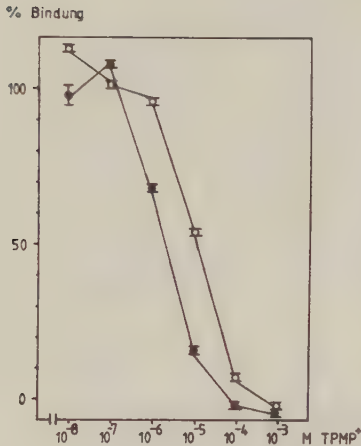


Abb. 38:

Verdrängung von  $^3\text{H}$ -PCP durch TPMP<sup>+</sup>

Proteinkonzentration: 0,65 mg/ml.  
 $[^3\text{H}\text{-PCP}]$ : 8,75 nM. Membranen waren in  $\text{Na}^+$ -Ringer equilibriert und wurden in  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt. Die Balken bezeichnen obere und untere Werte, wie sie durch Filtration 5 min und 5,5 min nach Verdünnung erhalten wurden, die Symbole repräsentieren den Mittelwert.  
 (-o-): Bindung in Abwesenheit und (-●-): Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Carbamylcholin.  
 100 %: Bindung in Abwesenheit von TPMP<sup>+</sup>, (-o-): 0,34 pMol/mg, (-●-): 1,36 pMol/mg; 0 %: Bindung in Gegenwart von 2 mM Amantadin, (-o-): 0,08 pMol/mg, (-●-): 0,13 pMol/mg.

Bindung überein (s. Abb. 33). Unspezifische Bindung wurde in diesem Experiment mit Amantadin bestimmt. Von Amantadin, das eigentlich ein Virostatikum ist, wurde gezeigt, daß es ebenfalls den Ionenkanal blockiert und mit einem anderen Kanalliganden, Perhydropyridostigmin, um dieselbe Bindungsstelle kompetiert (143).

Ein weiteres Argument für die Identität der TPMP<sup>+</sup>-Bindungsstelle als Lokalanästhetikabindungsstelle ist die Verdrängbarkeit von  $^3\text{H}$ -TPMP<sup>+</sup> durch Triton X-100. Triton X-100, ein nichtionisches Detergens, übt in submicellaren Konzentrationen ebenfalls Lokalanästhetika-ähnliche Wirkungen aus (98) (s. A 1.2.2.3) und ist

imstande,  $^3\text{H-TPMP}^+$ -Bindung in Gegenwart und Abwesenheit von Carbamylcholin vollständig zu verdrängen.

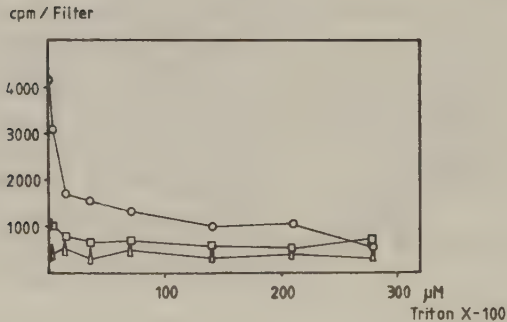


Abb. 39\*: Verdrängung von  $^3\text{H-TPMP}^+$  durch Triton X-100

Proteinkonzentration: 0,5 mg/ml.

[ $^3\text{H-TPMP}^+$ ]: 125 nM. Membranen waren in  $\text{Na}^+$ -Ringer equilibriert und wurden in  $\text{Na}^+$ -Ringer verdünnt. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus zwei Bestimmungen 5 min und 5,5 min nach Verdünnung. Die Membransuspension wurde vor der Verdünnung 15 min bei Raumtemperatur mit den angegebenen Konzentrationen an Triton X-100 inkubiert, die auch das Verdünnungsmedium enthielt. (-□-): Bindung ohne weiteren Zusätze; (-○-): Bindung in Gegenwart von 100 µM Carbamylcholin und (-Δ-): Bindung in Gegenwart von 100 µM Carbamylcholin und 5 mM unmarkiertem TPMP $^+$ .

Das durchschnittliche Molekulargewicht von Triton X-100 beträgt 628, die kritische Micellenkonzentration ist ca. 0,2 mg/ml, also etwa 320 µM (156).

\*: Dieses Experiment wurde in unserem Labor von H. Bayer durchgeführt.

## B 2.2.6 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das lipophile Kation TPMP<sup>+</sup> nicht nur potentialabhängig in AChR-reiche Membranfragmente akkumuliert, sondern auch spezifisch vom AChR-Komplex gebunden wird und dabei den Ionenkanal blockiert. Seine Bindung wird stimuliert durch cholinerge Agonisten und Antagonisten (außer z.B.  $\alpha$ -Bungarotoxin), während verschiedene Lokalanästhetika mit TPMP<sup>+</sup> um dieselbe Bindungsstelle kompetieren.

Zwei Fragenkomplexe sind in diesem Zusammenhang zu behandeln:

- die Natur der Bindungsstelle und
- der Mechanismus der Stimulierung durch cholinerge Effektoren.

Zum ersten Problem sind relativ sichere Aussagen möglich: da TPMP<sup>+</sup> in Konzentrationen, in denen es saturierbar an den AChR-Komplex bindet und den Ionenkanal blockiert, keinen Einfluß auf die ACh-Bindung ausübt, kann seine Bindungsstelle nicht die für cholinerge Agonisten sind. TPMP<sup>+</sup> ist also ein nicht kompetitiver Antagonist und bindet als solcher auch an dieselbe Bindungsstelle wie Lokalanästhetika. Dies wurde in verschiedenen Experimenten gezeigt: nicht nur die "klassischen" Lokalanästhetika wie Tetracain verdrängen TPMP<sup>+</sup>, auch Triton X-100 hat in relativ geringen Konzentrationen denselben Effekt, während andererseits TPMP<sup>+</sup> die Bindung des Kanalligenaden Phencyclidin inhibiert. Auch die Stimulierung der Bindung durch cholinerge Effektoren wurde mit anderen Kanalliganden beobachtet. Dies gilt insbesondere für

PCP (91, 104, 144) sowie für Perhydrohistrionicotoxin, das Derivat eines Alkaloides aus der Haut des kolumbianischen Frosches Dendrobates histrionicus (102, 103, 145 - 147). Ein Unterschied jedoch besteht im Bindungsverhalten von PCP und Perhydrohistrionicotoxin einerseits und TPMP<sup>+</sup> andererseits: Stimulierung der Bindung der beiden erstgenannten Drogen wird durch Desensitivierung teilweise inhibiert, während die TPMP<sup>+</sup>-Bindung auch an den desensitivierten Rezeptor mit hoher Affinität erfolgt. Obwohl sich also die Bindung von TPMP<sup>+</sup> und den anderen Kanalliganden gegenseitig ausschließt, scheinen die jeweiligen Bindungsstellen nicht völlig identisch zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht: so wurden unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Kanalliganden (Adiphenin, Dibucain, Dimethisoquin, Piperocain, Procain, Quinacrin, Tetracain und Amantadin) gefunden je nachdem, ob sie über die Inhibierung der PCP- oder der Perhydrohistrionicotoxin-Bindung bestimmt wurden (104). Zudem wird beispielsweise die Affinität von Piperocain für PCP-Bindungsstellen durch cholinerge Agonisten um das Zehnfache erhöht, die für Perhydrohistrionicotoxin-Bindungsstellen dagegen um 90 % vermindert (104, 148). Möglicherweise existiert also auf dem AChR-Komplex eine Domäne für die Interaktion von Liganden und Kanal mit mehreren, sich überlappenden Bindungsstellen, wobei durch die unterschiedlichen Verbindungen jeweils bestimmte Populationen besetzt werden. Konformationsänderungen des Rezeptorkomplexes, durch cholinerge Liganden verursacht, würden die einzelnen "Subklassen" in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen.

Die genaue Lokalisation der  $\text{TPMP}^+$ -Bindungsstelle kann durch die beschriebenen Versuche natürlich nicht bestimmt werden; es liegt jedoch nahe, sie an oder in der Nähe der Kanalöffnung zu vermuten. Wie in A 1.3 erwähnt, gibt es eine Reihe von Argumenten für die Beteiligung einer geladenen Gruppe, eventuell einer Carboxylatgruppe, an der Translozierung von Ionen durch den Kanal. Untersuchungen in unserem Labor ergaben nun Hinweise für die Mitwirkung einer negativ geladenen Gruppe an der  $\text{TPMP}^+$ -Bindung: Erniedrigung des pH-Wertes bewirkt vollständige Beseitigung der spezifischen  $\text{TPMP}$ -Bindung (149). Hierfür könnte die Protonierung einer Carboxylatgruppe verantwortlich sein. Wahrscheinlich bindet  $\text{TPMP}^+$  also an eine Kationenbindungsstelle, möglicherweise sogar an diejenige, die am ersten Schritt der Kanalfunktion beteiligt ist.

Recht unklar ist dagegen noch der Mechanismus der Stimulierung durch cholinerge Effektoren. Phänomenologisch betrachtet ist sie ein typischer allosterischer Effekt: die Bindung eines Liganden beeinflusst die Bindung eines anderen an einem anderen Ort. Sie mit dem bisher beschriebenen Rezeptorfunktionsmodell in Einklang zu bringen, ist jedoch fast unmöglich. Danach kann der Rezeptorkomplex in der Hauptsache drei Konformationen annehmen: eine im Ruhezustand, eine andere in der aktivierten Form und die dritte in der desensitivierten Form. Die aktivierte Form wird durch die Bindung eines Agonisten erreicht und weist eine vergleichsweise niedrige Affinität für Agonisten auf; die fortdauernde Einwirkung von Agonisten führt zur inaktiven desensitivierten Form des Rezeptors, die

eine höhere Affinität für Agonisten besitzt. Eldefrawi und Mitarbeiter deuteten die Stimulierung durch Agonisten mit einer bevorzugten Bindung der Kanalliganden an die aktive Form des Rezeptors; die Vorstellung, daß PCP oder Perhydrohistrionicotoxin dann an den offenen Kanal binden und ihn gleichsam verstopfen, ist tatsächlich sehr anschaulich. Desensitivierung jedoch inhibiert zwar in ihren Versuchen die Stimulierung bis zu einem gewissen Grad, verhindert sie aber nicht vollständig, so daß also nicht ausschließlich die aktive Konformation mit erhöhter Affinität bindet. Dies wird übrigens schon durch die Tatsache ausgeschlossen, daß auch Antagonisten wie  $\alpha$ -Tubocurarin stimulieren ohne den Rezeptor zu aktivieren. Die genannten Forscher erkennen diese Widersprüche zwar, können sie jedoch nicht aufklären und vermeiden deshalb, sie zu diskutieren.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß auch Antagonisten desensitivieren und es letztendlich die desensitivierte Konformation des AChR ist, in der Kanalliganden mit erhöhter Affinität gebunden werden. Dies widerspricht allerdings den gängigen Vorstellungen zur Wirkung von Antagonisten: sie binden bevorzugt an den Rezeptor im Ruhezustand, stabilisieren diesen und verhindern so die Aktivierung (74). Von einer Autorengruppe wurde nun berichtet, daß auch  $\alpha$ -Tubocurarin desensitiviert (genauer gesagt erhöhte es die Affinität des Rezeptors für Agonisten) (150); Ergebnisse zweier anderer Arbeitsgruppen widersprechen allerdings dieser Aussage: sie konnten mit sehr ähnlichen Methoden keine diesbezüglichen Effekte von  $\alpha$ -Tubocurarin feststellen (151, 152). Die Fähigkeit von Antagonisten zur Desensitivierung bleibt also zumindest fraglich.

Vielleicht ist es überhaupt sinnvoll, vom Konzept der diskreten Konformationsformen abzurücken und die Möglichkeit "gemischter" Konformationen zu postulieren. Der Rezeptorkomplex kann dann eine bestimmte Eigenschaft in mehreren Konformationen besitzen. Die Neuartigkeit dieser Vorstellung mag am Beispiel der Stimulierung durch Antagonisten verdeutlicht werden: der "klassischen" Theorie zufolge ist der Ruhezustand nach Bindung von Antagonisten identisch mit dem in Abwesenheit cholinergischer Liganden. Wenn dies tatsächlich in jeder Hinsicht der Fall wäre, dann sollte auch die TPMP<sup>+</sup>-Bindung an den AChR-Komplex durch z.B. d-Tubocurarin nicht beeinflußt werden. Da sie aber tatsächlich stimuliert wird, hat sich durch die Bindung des Agonisten eine Eigenschaft des AChR, nämlich eben seine Affinität zu TPMP<sup>+</sup> verändert. Auch für die desensitivierte Form des AChR würde diese Überlegung zutreffen.

Welche Erklärung für die Stimulierung der TPMP<sup>+</sup>-Bindung durch cholinerge Liganden sich auch immer als die richtige herausstellen wird - das Rezeptorfunktionsmodell, wie es in A 1.2.2.3 beschrieben wurde, kann so nicht ohne weiteres bestehen bleiben. Entweder desensitivieren auch Antagonisten oder, was wahrscheinlicher ist, es muß noch mindestens ein weiterer Konformationszustand des AChR-Komplexes existieren, entweder diskret oder "gemischt": derjenige, in dem der Rezeptor mit hoher Affinität Kanalliganden bindet.

Über das molekulare Äquivalent dieser "neuen Konformationsänderung" kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Vielleicht genügt die Bindung irgendeines

cholinergen Liganden, um die oben erwähnte Kationenbindungsstelle zu exponieren, ohne daß in jedem Fall der Kanal geöffnet wird. Sicher ist jedoch, daß diese Konformation sich vom Ruhezustand unterscheidet. Die Bindungsstelle(n) der Kanalliganden konnten mit einem Photoaffinitätsderivat des Lokalanästhetikums Trimethisoquin bzw. durch direkte UV-induzierte Reaktion mit Trimethisoquin, PCP und Perhydrohistrionictoxin kovalent markiert werden (90, 91). In unserem Labor wurden analoge Versuche mit  $TPMP^+$  durchgeführt (149, 153). In jedem Fall wurde nach Stimulierung nicht nur mehr Ligand inkorporiert, auch das Markierungsmuster der einzelnen Untereinheiten änderte sich. Bei den  $TPMP^+$ -Versuchen beispielsweise ergab sich eine Verschiebung des Einbaus von der  $\alpha$ -Untereinheit vor allem in die  $\delta$ -Untereinheit. Dies kann am plausibelsten durch die Änderung der Orientierung der betreffenden Untereinheiten relativ zur  $TPMP^+$ -Bindungsstelle erklärt werden, möglicherweise durch eine Änderung der Quartärstruktur des Komplexes.

Letztendlich soll nicht unerwähnt bleiben, daß auch in einem anderen System  $TPMP^+$  sich als mehr denn nur passiver "Potentialsensor" erwies. Zaritsky und Mitarbeiter veröffentlichten Arbeiten über die Effekte lipophiler Kationen (Tetraphenylarsonium, Tetraphenylphosphonium und  $TPMP^+$ ) auf die Beweglichkeit und andere Eigenschaften des Bakteriums Bacillus subtilis (154, 155). Sie fanden, daß durch diese Ionen verschiedene Parameter wie Schwimmgeschwindigkeit und Taumelfrequenz stark verändert waren und schlossen aus ihren Versuchen, daß  $TPMP^+$  und die anderen Ionen die Umsetzung der "protonmotive force", also des elektrochemischen Protonenpotentials, in Arbeit inhibieren. Es ist zumindest nicht auszuschließen, daß auch in diesem Fall Ionenkanäle oder andere ionentranslozierende Systeme von  $TPMP^+$  blockiert werden.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

Zwei Ionenkanalkomplexe erregbarer Membranen wurden mit Hilfe verschiedener Liganden bzw. Toxine untersucht.

### I Natriumkanal

Es konnte gezeigt werden, daß das Seeanemonentoxin ATX I spezifisch und potentialabhängig an ganze Krebsnerven bindet. ATX II und ATX III, die wie ATX I den Inaktivierungsmechanismus des Kanals inhibieren, kompetieren unterschiedlich stark mit ATX I um seine Bindungsstelle.

Die reversible Bindung von ATX I an eine Präparation axonaler Membranfragmente ist wie die an ganze Nerven verdrängbar, konnte jedoch nicht quantitativ beschrieben werden. Erklärungsmöglichkeiten für die mangelnde Reproduzierbarkeit der Experimente wurden diskutiert. In Versuchen zur Identifizierung der ATX I-Bindungsstelle durch kovalente Modifizierung wurden mit verschiedenen Methoden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Aus den Experimenten wurde geschlossen, daß ATX I für diese Untersuchungen nicht der geeignete Ligand ist.

### II Acetylcholinrezeptor

Ein gewöhnlich für Potentialmessungen verwendetes Reagens, das lipophile Kation Methyltriphenylphosphonium, bindet spezifisch an den Rezeptorkomplex und blockiert dabei den Ionenkanal. Seine Bindung wird stimuliert durch cholinerge Agonisten und Antagonisten. Verschiedene Mechanismen für diese Effekte wurden diskutiert.

C MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN

C 1 Material und Geräte

Tiere:

Astacus leptodactylus Lindenberg, Berlin

Torpedo marmorata wurden über Prof. Whittacker, Göttingen bezogen und stammten ursprünglich von der Station Biologique d'Arcachon, Frankreich.

Radioaktive Substanzen:

<sup>3</sup>H-Acetylcholiniodid 50-100 mCi/mMol, New England Nuclear, Dreieich

<sup>3</sup>H-Methyltriphenylphosphoniumiodid 60 Ci/mMol, New England Nuclear, Dreieich

<sup>22</sup>NaCl 200 µCi/ml, New England Nuclear, Dreieich

Na<sup>125</sup>I 100 mCi/ml, Amersham Buchler, Braunschweig

<sup>3</sup>H-Phencyclidin 48 Ci/mMol, New England Nuclear, Dreieich

Sonstige Chemikalien:

Amantadin Sigma, München

ATX I - III waren ein Geschenk von Dr. L. Beress, Universität Kiel, bzw. wurden in unserem Labor unter der Leitung von J. Zwick, Universität Kiel, hergestellt

BSA für die Waschlösungen in den Filtrationstests:  
"Albumin stock solution",  
Kat. Nr. 909-10, Sigma, München

α-Bungarotoxin Sigma, München

1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol Pierce, Rockford, Illinois, USA

4,4'-Difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfon Pierce, Rockford, Illinois, USA

|                             |                                                                                                                 |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HEPES                       | Merck, Darmstadt                                                                                                |
| Lactoperoxidase             | Sigma, München                                                                                                  |
| Methyltriphenylphosphonium  | Sigma, München                                                                                                  |
| Omnifluor                   | New England Nuclear, Dreieich                                                                                   |
| Ouabain                     | Serva, Heidelberg                                                                                               |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | Serva, Heidelberg                                                                                               |
| Protosol                    | New England Nuclear, Dreieich                                                                                   |
| Sephadex                    | Pharmacia, Uppsala, Schweden                                                                                    |
| Skorpiontoxin               | aus <u>Leiurus quinquestriatus</u> ;<br>war ein Geschenk von<br>Dr. W.A. Catterall, Seattle,<br>Washington, USA |
| Supertron                   | Kontron, München                                                                                                |
| Triton X-100                | Serva, Heidelberg                                                                                               |

Alle übrigen Chemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und stammten von den Firmen Boehringer (Ingelheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

#### Geräte:

|                         |                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Densitometer            | 2202 Ultrosan Laser Densitometer, LKB, Bromma, Schweden                                                                                                                         |
| Elektrophoreseapparatur | SE 600, Hoefer, San Francisco, Kalifornien, USA                                                                                                                                 |
| Filter                  | Diapor Membranfilter, Porendurchmesser 0,45 µm, Amicon, Witten<br>EHWP 02500, Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore, Neu Isenburg<br>Selectron BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel |

|                                  |                                                                                                                     |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Flüssigkeitsszintillationszähler | MR 300, Kontron, München                                                                                            |
| Gradientenpumpe                  | Modell 380, ISCO, Lincoln, Nebraska, USA                                                                            |
| Homogenisierungsgeräte           | Commercial Blendor, Waring, New Hartford, Connecticut, USA<br>Teflon-Homogenisator, Typ 853202, Braun, Melsungen    |
| Photometer                       | PMQ 3, Zeiss, Oberkochen                                                                                            |
| Rotoren                          | SS 34, Sorvall, Bad Nauheim<br>SW 25.2, Beckman, München<br>TFT 65, Kontron, München                                |
| UV-Lampe                         | Typ 5241, 0,35 W, Quarzlampen GmbH, Hanau                                                                           |
| Zentrifugen                      | Kühlzentrifuge RC 5B, Sorvall, Bad Nauheim<br>Ultrazentrifuge TGA-65, Kontron, München<br>Airfuge, Beckman, München |

C 2 Methoden

C 2.1 Radioaktive Markierung von ATX I mit  $^{125}\text{I}$

ATX I wurde mit Hilfe von Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) radioaktiv markiert (115). Bei Raumtemperatur werden zu einer Lösung von 20  $\mu\text{g}$  (4 nMol) ATX I, 1  $\mu\text{g}$  Lactoperoxidase und 5  $\mu\text{l}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  (0,25 - 1 nMol; je nach spezifischer Radioaktivität der vom Hersteller gelieferten Jodcharge) in 65  $\mu\text{l}$  einer 50 mM Kaliumphosphatlösung (pH 7.4) in ein-Minuten-Intervallen drei 5  $\mu\text{l}$ -Portionen Wasserstoffperoxid (je 49 nMol gegeben. Fünfzehn Minuten nach Zugabe des letzten Aliquots wird das Toxin von der Reaktionsmischung durch Gelfiltration mit Sephadex G 10 abgetrennt. Die Dimensionen der Säule betragen 0,7 cm x 14 cm; eluiert wird in 0,5 ml-Fractionen mit  $\text{Na}^+$ -Ringer (160 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM PMSF, 10 mM HEPES pH 7.4) enthaltend 1 mg/ml Gelatine.

C 2.2 Präparation axonaler Membrangragnmente aus Krebsgehnerven

Die Präparation wurde nach Denburg (119) durchgeführt.

Lösung A: 320 mM Saccharose in einem 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.8).

Lösung B: 1 M  $\text{MgSO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Sämtliche Präparationsschritte werden im Eisbad vorgenommen. 30 - 100 Nerven werden aus Scheren des Krebses Astacus leptodactylus entfernt und mit einer Schere grob zerkleinert. Nach Zugabe von 5 ml Lösung A wird das Material in einem Teflonhomogenisator fragmentiert (jeweils fünf Durchgänge bei 500 U/min und 1000 U/min).

Die erhaltene Suspension wird 15 min bei 1000 g und 4° C zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes wird das Pellet in 5 ml Lösung A im Teflonhomogenisator wie oben beschrieben resuspendiert und die erhaltene Suspension erneut bei 1000 g zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden bei 9000 g und 4° C 15 min zentrifugiert. Ein erneuter Resuspendierungs- und Zentrifugationsschritt, wie von Denburg beschrieben, wurde anfänglich vorgenommen, später jedoch wegen der sehr geringen Ausbeute fallengelassen. Nach Zugabe von 0,4 ml Lösung B wird der Überstand aus der letzten Zentrifugation 90 min bei 100 000 g und 4° C zentrifugiert und das Pellet, das die Membranfragmente enthält, im gewählten Puffer suspendiert.

### C 2.3      Präparation AChR-reicher Membranfragmente aus             Torpedo-Electroplaques

Die in unserem Labor verwendete Methode ist in (92) beschrieben.

#### Verwendete Puffer

|            |                           |        |                                  |
|------------|---------------------------|--------|----------------------------------|
| Puffer I:  | 0,02 M Na/PO <sub>4</sub> | pH 7.4 |                                  |
|            | 0,40 M NaCl               |        |                                  |
|            | 0,02 % NaN <sub>3</sub>   |        | EDTA undPMSF werden              |
|            | 2,00 mM EDTA              |        | in beide Puffer vor              |
|            | 0,10 mM PMSF              |        | Beginn der Präpara-              |
|            |                           |        | tion frisch zugege-              |
|            |                           |        | ben.                             |
|            |                           |        | (EDTA 0,2 M in H <sub>2</sub> O, |
| Puffer II: | 0,02 M Na/PO <sub>4</sub> | pH 7.4 | PMSF 0,1 M in Ethanol)           |
|            | 0,02 % NaN <sub>3</sub>   |        |                                  |
|            | 2,00 mM EDTA              |        |                                  |
|            | 0,10 mM PMSF              |        |                                  |

Der Zitterrochen Torpedo marmorata wird nach seinem Eintreffen getötet, die elektrischen Organe herauspräpariert, in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Gewebe sollte innerhalb vier Wochen verbraucht werden.

Die Präparation wird bei 0 bis  $5^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. 90-110 g Gewebsstücke werden mit Schere oder Skalpell weiter zerkleinert, nachdem das anhaftende Bindegewebe und die Haut entfernt worden sind. Das Gewebe wird in 180 ml Puffer I gegeben und 3 min im Waring Blendor bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wird bei 27 000 g 90 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wird in 90 ml Puffer II aufgenommen und 3 min im Waring Blendor bei niedriger Geschwindigkeit resuspendiert. Es folgt eine weitere Zentrifugation von 90 min bei 39 000 g. Der letzte Schritt wird wiederholt.

Das Pellet wird in 40 ml Puffer II aufgenommen und 1,5 min bei niedriger Geschwindigkeit im Waring Blendor resuspendiert. Die Suspension wird 10 min einer Zentrifugation bei 1000 g unterworfen. Über einem relativ lockeren Sediment von Bindegewebe befindet sich dann eine trübe Suspension von Membranfragmenten, unter den genannten Bedingungen etwa 20-25 ml. Sie wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und auf drei Sucrosegradienten gegeben (50 ml, 25 % bis 50 % w/v in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ).

In einem SW 25 Rotor wird 6 h bei 59 000 g zentrifugiert um rezeptorreiche Membranfragmente von solchen mit hoher Esteraseaktivität zu trennen. Die Gradienten werden dann

in 2 ml Fraktionen aufgeteilt, z.B. mittels einer vorsichtig bis auf den Boden geführten Kanüle und einer angeschlossenen Pumpe.

Durch einen  $\alpha$ -Toxinbindungstest und eine Proteinbestimmung können die Gradienten auf ihre spezifische Aktivität hin untersucht werden; hierauf wurde jedoch oft verzichtet, da sich die aktivsten Fraktionen durch ihre Trübung auch mit dem Auge gut ausmachen lassen (gewöhnlich wurden 5 bis 7 Fraktionen für die darauffolgenden Experimente verwendet).

Die rezeptorreichen Membranfragmente können aus der Sucrose durch Verdünnen in  $H_2O$  und anschließendes Zentrifugieren im SS 34 Rotor bei 20 000 g entfernt werden. Das Pellet kann dann in einem geeigneten Puffer resuspendiert werden.

#### C 2.4 Bindungsversuche

##### C 2.4.1 Einiges zur Theorie

##### C 2.4.1.1 Der einfache Fall

Wird die Bindung eines Liganden an rezeptorhaltigen biologisches Material gemessen, so findet man neben eine Bindungskomponente, die durch einen Überschuß an kompetierenden Liganden verdrängbar ist, meist auch einen linearen, nicht verdrängbaren Anteil. Dieser Teil der Bindung, auch als nicht saturierbar bezeichnet, wird allgemein als unspezifisch betrachtet und kann etwa durch adsorptive Wechselwirkungen des Liganden mit z.B. der Lipidphase von Membranvesikeln erklärt werden. Abb. 40 zeigt eine schematische Darstellung dieser Verhältnisse.

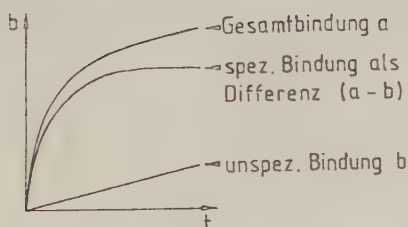
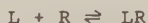


Abb. 40: Direkte Auftragung der Bindung (b) in Abhängigkeit der Konzentration des eingesetzten Liganden (t). Schematisch; Erklärung im Text.

Im Folgenden wird unter "Bindung" immer spezifische Bindung verstanden.

Die Bindung eines Liganden L an ein Rezeptorprotein R, die nach dem allgemeinen Schema



verläuft, läßt sich unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes folgendermaßen beschreiben\*:

$$K_D = \frac{[L_f] \cdot [R_f]}{[LR]} \quad \text{oder} \quad K_D = \frac{[L_f] ([R_o] - [L_b])}{[L_b]} \quad (1)$$

---

\*:Die Indices f, b und o bedeuten "frei", "gebunden" und "gesamt".

Auflösung von Gleichung (1) nach  $L_b$  ergibt:

$$[L_b] = \frac{[R_o] \cdot [L_f]}{K_D + [L_f]} \quad (2)$$

Es gilt:  $[R_o] = [L_b \text{ max}]$

$$\text{so daß: } [L_b] = \frac{[L_b \text{ max}] \cdot [L_f]}{K_D + [L_f]} \quad (3)$$

Im Allgemeinen wird die Bedingung erfüllt sein, daß die Gesamtkonzentration des Liganden wesentlich größer ist als die des gebundenen (d.h.  $[L_f] \approx [L_o]$ ). Ersetzen des Terms  $[L_f]$  durch  $[L_o]$  in Gleichung (3) und Linearisierung ergibt:

$$\frac{1}{[L_b]} = \frac{1}{[L_o]} \cdot \frac{K_D}{[L_b \text{ max}]} + \frac{1}{[L_b \text{ max}]}$$

Die "Doppelt reziproke Auftragung" von Daten kann also zur Bestimmung von  $K_D$  und  $[L_b \text{ max}]$  verwendet werden.

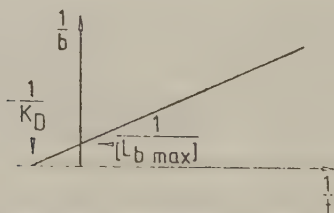
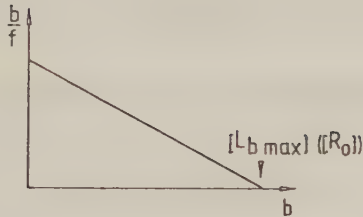


Abb. 41: Doppelt reziproke Auftragung von Bindungsdaten. Schematisch; Erklärung im Text.

Eine andere Umformung von Gleichung (3) eröffnet die Möglichkeit zur Auftragung von Daten im "Scatchard-plot":

$$\frac{[L_b]}{[L_f]} = - \frac{1}{K_D} \cdot [L_b] + \frac{[L_b \text{ max}]}{K_D} \quad (4)$$



**Abb. 42:** Scatchard-Auftragung von Bindungsdaten.  
Schematisch; Erklärung im Text.

Die Steigung der Geraden ergibt den negativ reziproken Wert der Dissoziationskonstante. Abweichungen von der Linearität sind im "Scatchard-plot" leicht zu erkennen; eine im Anfangsteil abwärts gebogene Kurve deutet hin auf positive Kooperativität der Bindung, eine aufwärts gebogene Kurve kann zweierlei bedeuten: einmal negative Kooperativität, zum anderen das Vorhandensein zweier oder mehr Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität.

Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten muß im Einzelfall getroffen werden; in jedem Fall jedoch erlaubt die Auswertung der Auftragung entsprechend der zweiten Alternative eine gute phänomenologische Beschreibung des Systems.

Um "Kooperativität" zu quantifizieren, führte Hill einen Koeffizienten  $n_H$  in die Gleichung für die Dissoziationskonstante ein:

$$K_D = \frac{([R_O] - [L_b]) \cdot [L_f]^{n_H}}{[L_b]}$$

Nach Umformen und Logarithmieren erhält man:

$$\log \left( \frac{[L_b]}{[R_O] - [L_b]} \right) = n_H \cdot \log [L_f] - \log K_D$$

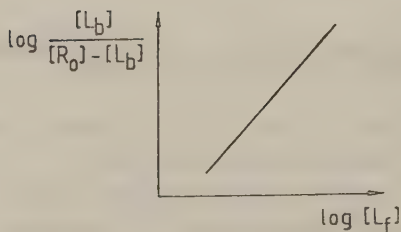


Abb. 42: Hill-Auftragung von Bindungsdaten.  
Schematisch; Erklärung im Text.

Die Steigung der Geraden ergibt den Wert des Hill-Koeffizienten. Bei negativ kooperativen Systemen ist  $n_H < 1$ , bei nicht kooperativen Systemen gilt  $n_H = 1$ , bei positiv kooperativen  $n_H > 1$ . Der Hill-Koeffizient zeigt zudem die Mindestanzahl von Bindungsstellen im untersuchten kooperativen System an.

#### C 2.4.1.2 Bindung in Gegenwart eines kompetierenden Liganden

Anmerkung: Die folgende Ableitung bis zur Gleichung (10) ist leicht modifiziert aus einer Arbeit von Cuatrecasas und Mitarbeitern entnommen worden (157).

In vielen Versuchen wird die Bindung eines radioaktiv markierten Liganden L in Abwesenheit und Gegenwart eines unmarkierten Liganden I gemessen. Kompetieren beide um dieselbe Bindungsstelle nach dem Schema  $RL \rightleftharpoons L + R + I \rightleftharpoons RI$  können aus den Verdrängungskurven bei bekannter Dissoziationskonstante  $K_D$  des markierten Liganden Informationen über die Dissoziationskonstante  $K_D^I$  des unmarkierten Liganden gewonnen werden. Ist nur markierter Ligand anwesend, gilt für das Bindungsgleichgewicht:

$$K_D = \frac{([R_O] - [RL]) \cdot ([L_O] - [RL])}{[RL]} \quad (1)$$

Wird genügend unmarkierter Ligand I zugefügt, um 50 % des markierten Liganden aus seiner Bindung zu verdrängen, wird ein neues Bindungsgleichgewicht erreicht:

$$K_D = \frac{([R_O] - \frac{1}{2} [RL] - [RI]) \cdot ([L_O] - \frac{1}{2} [RL])}{\frac{1}{2} [RL]} \quad (2)$$

$\frac{1}{2} [RL]$  ist natürlich die Konzentration des gebundenen Liganden L unter diesen Bedingungen. Division der Gleichung (1) durch Gleichung (2) und Auflösen nach  $[RI]$  ergibt:

$$[RI] = ([R_o] - \frac{1}{2} [RL]) - \frac{([R_o] - [RL]) \cdot ([L_o] - [RL])}{2 ([L_o] - \frac{1}{2} [RL])} \quad (3)$$

Die Dissoziationskonstante  $K_D^I$  des unmarkierten Liganden kann sich von der des markierten um den Faktor n unterscheiden, so daß gilt:

$$\frac{([R_o] - \frac{1}{2} [RL] - [RI]) \cdot ([I_o] - [RI])}{[RI]} = K_D^I = n K_D = \quad (4)$$

$$\frac{n ([R_o] - \frac{1}{2} [RL] - [RI]) \cdot ([L_o] - \frac{1}{2} [RL])}{\frac{1}{2} [RL]}$$

Auflösung des ersten und letzten Ausdrucks von Gleichung (4) nach  $[RI]$  ergibt:

$$[RI] = \frac{(\frac{1}{2} [RL]) \cdot ([I_o] - [RI])}{n ([L_o] - \frac{1}{2} [RL])} \quad (5)$$

Die Konzentration von freiem unmarkierten Liganden  $I_f$ , bei der 50 % des markierten Liganden verdrängt wird, also  $([I_o] - [RI])$ , kann als  $[I_{50}]$  definiert werden. Einsetzen des Wertes für  $[RI]$  aus Gleichung (5) in Gleichung (3) und Auflösung nach  $([I_o] - [RI])/n$  ergibt:

$$\frac{([I_O] - [RI])}{n} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{[I_{50}]}{n} = \quad (6)$$

$$\frac{2([R_O] - \frac{1}{2}[RL]) \cdot ([L_O] - \frac{1}{2}[RL])}{[RL]} - \frac{([R_O] - [RL]) \cdot ([L_O] - [RL])}{[RL]}$$

Der erste Ausdruck der rechten Seite von Gleichung (6) kann auch geschrieben werden als:

$$\begin{aligned} & \frac{2([R_O] - \frac{1}{2}[RL]) \cdot ([L_O] - \frac{1}{2}[RL])}{[RL]} = \\ & \frac{2[R_O][L_O] - [R_O][RL] - [L_O][RL] + \frac{1}{2}[RL]^2}{[RL]} \end{aligned} \quad (7)$$

Subtraktion von  $([R_O] + [L_O] - \frac{3}{2}[RL])$  vom Bruch auf der rechten Seite von Gleichung (7) und anschließende Addition ergibt:

$$\frac{2([R_O] - \frac{1}{2}[RL]) \cdot ([L_O] - \frac{1}{2}[RL])}{[RL]} = \quad (8)$$

$$\frac{2[R_O][L_O] - 2[R_O][RL] - 2[L_O][RL] + 2[RL]^2}{[RL]} +$$

$$[R_O] + [L_O] - \frac{3}{2}[RL]$$

Umwandlung des ersten Ausdrucks der rechten Seite von Gleichung (8) und Einsetzen in Gleichung (6) ergibt:

$$\frac{[I_{50}]}{n} = \frac{2([R_O] - [RL])([L_O] - [RL])}{[RL]} + \quad (9)$$

$$[R_O] + [L_O] - \frac{3}{2} [RL] - \frac{([R_O] - [RL])([L_O] - [RL])}{[RL]}$$

Addition des ersten und letzten Ausdrucks der rechten Seite von Gleichung (9), Multiplikation beider Seiten mit n und Ersetzen von  $([R_O] - [RL])([L_O] - [RL]) / [RL]$  durch  $K_D$  (Gleichung (1)) ergibt:

$$[I_{50}] = n(K_D + [L_O] + [R_O] - \frac{3}{2} [RL]) = \quad (10)$$

$$n K_D + n ([L_O] + [R_O] - \frac{3}{2} [RL])$$

oder, da  $K_D^I = n K_D$  (Gleichung (4)) und  $n = K_D^I / K_D$ :

$$[I_{50}] = K_D^I + \frac{K_D^I}{K_D} ([L_O] + [R_O] - \frac{3}{2} [RL]) \quad (11)$$

Auflösung von Gleichung (11) nach  $K_D^I$  ergibt:

$$K_D^I = \frac{[I_{50}]}{1 + \frac{[L_O] + [R_O] - \frac{3}{2} [RL]}{K_D}} \quad (12)$$

Dies ist eine allgemeingültige Formel für die Berechnung von  $K_D^I$  aus der Konzentration von I bei halbmaximaler Verdrängung von L.

Unter der Bedingung, daß  $[L_o]$  bedeutend größer ist als  $[R_o]$ ; also  $[R_o] \cdot \frac{3}{2}[RL] \ll [L_o]$ , kann Gleichung (12) vereinfacht werden:

$$K_D^I = \frac{[I_{50}]}{1 + \frac{[L_o]}{K_D}} \quad (13)$$

#### C 2.4.2 $^{125}I$ -ATX I-Bindung an ganze Krebsnerven

Der Versuch erfolgt bei 4° C. Frisch präparierte Nerven werden im gewählten Puffer mit den jeweils verwendeten nichtradioaktiven Toxinen (z.B. ATX I-III) zwei Stunden vorinkubiert. Anschließend wird  $^{125}I$ -ATX I zugegeben, und nach weiteren 16 Stunden bei 4° C werden die Nerven in je 100 ml Puffer fünf Sekunden gewaschen, zum Abtropfen fünf Sekunden auf ein Filterpapier gelegt und gewogen. Nach dem Wiegen werden sie dann mit Hilfe von 400 µl Protosol und 100 µl Wasser bei 50° C aufgelöst und nach Zugabe von 10 ml einer Szintillatormischung (Toluol mit 3 % Protosol und 0,4 % Omnifluor) wird die Radioaktivität der Lösung gemessen.

#### C 2.4.3 $^{125}I$ -ATX I-Bindung an axonale Membranfragmente

Die Bindung wird bei 20 -22° C mit einem Filtrations-test gemessen. Die Membranfragmente (Proteinkonzentration möglichst im Bereich 5 - 10 mg/ml) werden im gewählten Puffer enthaltend 1 mg/ml BSA mit den gewünschten Zusätzen (z.B. nichtradioaktive Toxine) 30 min vorinkubiert. Zum Start der Bindungsreaktion wird die Suspension 1:10 in Puffer enthaltend 1 mg/ml BSA und  $^{125}I$ -ATX I verdünnt. Zu definierten Zeitpunkten

werden 100 - 200  $\mu$ l der Suspension in 3 ml eiskalten  $\text{Na}^+$ -Ringer (160 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM PMSF) mit 1 mg/ml BSA verdünnt und sofort im Wasserstrahlvakuum filtriert. Die Filter (Amicon Diapor, Porendurchmesser 0,45  $\mu$ m) werden vorher mindestens eine Stunde in  $\text{Na}^+$ -Ringer (10 mg/ml BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3 ml eiskaltem  $\text{Na}^+$ -Ringer (1 mg/ml BSA) werden die Filter mit 0,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in 5 ml Dioxan/Omnifluor 8 g/l zwei Stunden geschüttelt und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

C 2.4.4  $^3\text{H}$ -TPMP $^+$ - und  $^3\text{H}$ -PCP-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente

Die Bindung wird bei 20 - 22 $^{\circ}$  C mit einem Filtrations-test gemessen. Die Durchführung des Versuches ist im Wesentlichen identisch mit der im vorherigen Abschnitt für  $^{125}\text{I}$ -ATX I und axonale Membranfragmente beschriebenen Vorgehensweise.

Unterschiedlich ist der verwendete Filtertyp: Millipore EHWP 02500, Porendurchmesser 0,45  $\mu$ m. Nach der Filtration und zweimaligem Waschen werden die Filter mit 0,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in 5 ml Supertron zwei Stunden geschüttelt und ihre Radioaktivität im Szintillations-zähler bestimmt.

C 2.4.5  $^3\text{H}$ -ACh-Bindung an AChR-reiche Membranfragmente

Die Bindung wird mittels Gleichgewichtszentrifugation bei 20 - 22 $^{\circ}$  C gemessen.

Die Membransuspension wird 30 min bei Raumtemperatur

mit  $10^{-4}$  M Eserin inkubiert, um eventuell vorhandene Reste von Acetylcholinesterase-Aktivität zu blockieren. Danach werden die gewünschten  $^3\text{H}$ -ACh-Konzentrationen eingestellt. Nach weiteren 5 min Inkubation werden 165  $\mu\text{l}$ -Aliquots in einer Beckman "airfuge" 30 min zentrifugiert. Vor und nach Zentrifugation werden 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen und mit 5 ml Supertron im Szintillationszähler vermessen. Aus den entsprechenden cpm-Werten kann die "gesamte" und die "freie"  $^3\text{H}$ -ACh-Konzentration bestimmt werden.

C 2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Verwendet wurden Flachgele, die nach der von Lämmli beschriebenen Methode (125) hergestellt wurden.

Zusammensetzung einiger SDS-Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen

| Lösung (ml)       | Acrylamidkonzentration (%) |       |       |       |       |
|-------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                   | 20                         | 15    | 10    | 7.5   | 5     |
| <u>Trenngel</u>   |                            |       |       |       |       |
| Acrylamid A       | -                          | -     | 13,50 | 10,10 | 6,75  |
| Acrylamid B       | 13,50                      | 10,10 | -     | -     | -     |
| Wasser            | 8,40                       | 11,80 | 8,40  | 11,80 | 15,15 |
| Trenngelpuffer    | 7,50                       | 7,50  | 7,50  | 7,50  | 7,50  |
| Ammoniumpersulfat | 0,30                       | 0,30  | 0,30  | 0,30  | 0,30  |
| T E M E D         | 0,03                       | 0,03  | 0,03  | 0,03  | 0,03  |
| 10 % SDS          | 0,30                       | 0,30  | 0,30  | 0,30  | 0,30  |

Sammelgel (3,5 % Acrylamidkonzentration)

|                   |      |
|-------------------|------|
| Wasser            | 6,00 |
| Sammelgelpuffer   | 2,50 |
| Acrylamid A       | 1,35 |
| Ammoniumpersulfat | 0,10 |
| 10 % SDS          | 0,10 |
| TEMED             | 0,01 |

|                       |                                                                     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Acrylamid A:          | 22,2 g Acrylamid und 0,6 g Methyl-<br>bisacrylamid in 100 ml Wasser |
| Acrylamid B:          | 44,4 g Acrylamid und 1,2 g Methyl-<br>bisacrylamid in 100 ml Wasser |
| Ammoniumpersulfat:    | 100 mg in 1 ml Wasser                                               |
| SDS (10 %):           | 1 g in 10 ml Wasser                                                 |
| Trenngelpuffer:       | 18,15 g Tris in 100 ml Wasser (mit<br>HCl auf pH 8,8 eingestellt)   |
| Sammelgelpuffer:      | 6 g Tris in 100 ml Wasser (mit HCl<br>auf pH 6,8 eingestellt)       |
| Elektrophoresepuffer: | 6 g Tris, 28,8 g Glycin und 2 g SDS<br>in 2 l Wasser (pH 8,3)       |

Vorbereitung der Proben und Elektrophorese:

Zu 10 bis 50 µl einer Probelösung werden 5 µl Mercaptoethanol, 5 µl einer 20 %igen SDS-Lösung und 30 µl Elektrophoresepuffer gegeben und 2 bis 4 Stunden inkubiert. Anschließend werden 5 µl einer 50 %igen Saccharoselösung und 5 µl einer 0,1 %igen Bromphenolblaulösung zugegeben und die Elektrophorese durchgeführt (Stromstärke während der Elektrophorese: 5 mA/Flachgel).

Färben der Gele:

1,5 Stunden in einer Lösung von 1 g Coomassie-Blau, 250 ml Isopropanol und 100 ml Eisessig in 650 ml Wasser.

Entfärben der Gele:

3 Stunden in einer Lösung von 300 ml Methanol und 100 ml Eisessig in 600 ml Wasser. Zur Erstellung der Eichkurven zur Bestimmung von Molekulargewichten wurden Kalibrierungsmischungen der Firma Pharmacia verwendet.

C 2.6

$^{22}\text{Na}^+$ -Efflux aus AChR-reichen Membranvesikeln.

Die in unserem Labor verwendete Methode ist in (92) beschrieben.

Effluxlösung: 3,00 mM Na/PO<sub>4</sub> pH 7,0  
0,16 M KCl  
5,00 mM NaCl  
2,00 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,00 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,02 % NaN<sub>3</sub>

Equilibrierung der rezeptorreichen Membranvesikel mit <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>:

Die rezeptorreichen Fraktionen aus den Sucrosegradienten der in C 2.3 beschriebenen Membranpräparation werden vereinigt, 1:8 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und 1 h bei 20 000 g und 4° C zentrifugiert. Das Pellet (rezeptorreiche Membranvesikel) wird im gewählten Puffer aufgenommen (Protein-Endkonzentration: 5 - 10 mg/ml) und über Nacht bei 5° C mit 20 µCi/ml <sup>22</sup>NaCl inkubiert.

Effluxmessung:

Sämtliche Lösungen werden im Eisbad gekühlt. Zum Zeitpunkt t = 0 wird die Inkubationslösung 140-fach in Effluxlösung verdünnt (50 µl auf 7 ml). 1 ml-Aliquots werden in Minutenabständen durch Selectron BA 85-Filter (Porendurchmesser: 45 µm) filtriert. Mit je 5 ml Ringer wird viermal nachgewaschen. Die Radioaktivität in den auf den Filtern verbleibenden rezeptorreichen Membranvesikeln wird im Scintillationszähler bestimmt (nach Einlegen der Millipore-Filter in die verschiedenen Scintillationszählfläschchen wird zunächst 0,5 ml H<sub>2</sub>O, dann 10 ml Scintillatorlösung (8 g/l Omnifluor in Dioxan) zugegeben; die Gefäße werden kräftig geschüttelt, um ein Auflösen der Filter zu gewährleisten). Der Leerwert wird durch die Filtration einer die entsprechende Menge <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> enthaltenden Effluxlösung bestimmt.

Soll der Efflux stimuliert werden, so wird vor dem Verdünnen der Inkubationslösung Carbamylcholin aus einer Stammlösung (z.B. 1 M in  $H_2O$ ) bis zur gewünschten Endkonzentration in die Effluxlösung pipettiert.

## C 2.7 Proteinbestimmung nach der Folin-Methode

Diese Methode wurde von Lowry und Mitarbeitern entwickelt (122).

Lösungen

|   |                                                                                                               |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | 1 g NaOH, 20 g $Na_2CO_3$ und<br>0,2 g $C_4H_4KNaO_6 \times 4 H_2O$ (Kaliumnatrium-<br>tartrat) in 1 l Wasser |
| B | 0,5 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$ in 100 ml Wasser                                                                 |
| C | 50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B                                                                         |
| D | 50 Teile Folin-Ciocalteu-Reagenz und<br>50 Teile Wasser                                                       |

Verschiedene Eichproteinmengen (Rinderserumalbumin) sowie die Proben werden mit einem entsprechenden Puffer auf 100  $\mu$ l Volumen aufgefüllt. Danach wird zu jeder Probe 1 ml Lösung C gegeben, geschüttelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, 100  $\mu$ l Lösung D zugegeben und erneut geschüttelt. Nach weiteren 30 Minuten Messung der Absorption der Proben bei 546 oder 750 nm.

## C 2.8 Messung der Na/K-ATPase-Aktivität

Die Messung wurde wie in (121) von Bonting und Mitarbeitern beschrieben vorgenommen; die Bestimmung von Phosphat erfolgte jedoch turbidometrisch nach der von Eibl und Lands entwickelten Methode (124).

Na/K-ATPase-Aktivität:

|          | MgSO <sub>4</sub> | KCl | NaCl | EDTA | Tris | Ouabain |
|----------|-------------------|-----|------|------|------|---------|
| Lösung A | 3                 | 5   | 58   | 0,1  | 92   | 0       |
| Lösung B | 3                 | 5   | 58   | 0,1  | 92   | 0,1     |

Angegeben sind Konzentrationen in mM; der pH der Testlösungen beträgt 7,5.

Die Differenz der ATPase-Aktivitäten in Lösung A und Lösung B ergibt den Ouabain-inhibierbaren Anteil, also denjenigen, der der Na/K-ATPase zuzuschreiben ist.

15 µl der zu bestimmenden Probelösung werden in 127,5 µl Testlösung gegeben und die Reaktion mit 7,5 µl einer 20 mM ATP-Lösung gestartet. Nach einer Stunde Inkubation bei 20-22° C wird die Reaktion durch Zugabe von 75 µl eiskalter 3 M Trichloressigsäure-Lösung gestoppt.

Nach kurzer Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge um eventuelle Niederschläge zu pelletieren, wird aus dem Überstand das freigesetzte Phosphat bestimmt. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgt durch Zugabe der Trichloressigsäurelösung sofort nach Start mit ATP.

Phosphatbestimmung:

Lösung A: 1 % Triton X-100 in H<sub>2</sub>O

Lösung B: 2,5 % (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
(Ammoniumheptamolybdat) in 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  
frisch hergestellt

30  $\mu\text{l}$  der Probelösung werden in 870  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gegeben, mit 10  $\mu\text{l}$  Lösung A versetzt und durchmischt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Lösung B entwickelt sich eine Trübung, deren Ausmaß nach exakt 20 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Messung der "Absorption" bei 660 nm bestimmt wird. Die Trübung ist direkt proportional zur Phosphatkonzentration in der Probe bis zu einem Bereich von etwa 1 mM; Kalibrierungskurven werden mit Natriumdihydrogenphosphatlösungen bekannter Konzentration erstellt.

# LITERATUR

- 1 Schmidt, R.F. (1974) Grundriß der Neurophysiologie, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 72
- 2 Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) J.Physiol. London 117, 500-544
- 3 Hille, B. (1972) J.Physiol. 59, 637-658
- 4 Narahashi, T. (1974) Physiol.Rev. 54, 813-889
- 5 Catterall, W.A. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 15-43
- 6 Kao, C.Y. (1966) Pharmacol. Rev. 18, 997-1049
- 7 Narahashi, T., Moore, J.W., Scott, W.R. (1964) J.Gen. Physiol. 47, 965-974
- 8 Nakamura, Y., Nakajima, S., Grundfest, H. (1965) J.Gen.Physiol. 48, 985-996
- 9 Narahashi, T., Anderson, N.C., Moore, J.W. (1966) Science 153, 765-767
- 10 Hille, B. (1968) J.Gen.Physiol. 51, 199-219
- 11 Narahashi, T., Haas, H.G., Terrien, E.F. (1967) Science 157, 1441-1442
- 12 Hafemann, D.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 266, 548-556
- 13 Almers, W., Levinson, S.R. (1975) J.Physiol. London 247, 483-509
- 14 Catterall, W.A., Morrow, C.S., Hartshorne, R.P. (1979) J.Biol.Chem. 254, 11379-11387
- 15 Henderson, G., Ritchie, J.M., Strichartz, G.R. (1973) J.Physiol. London 235, 783-804
- 16 Huang, L.M., Catterall, W.A., Ehrenstein, G. (1979) J.Gen.Physiol. 73, 839-854
- 17 Ulbricht, W. (1969) Ergebn.Physiol.Biol.Chem.Exp. Pharmakol. 61, 48-71
- 18 Khodorov, B.I. (1978) in: Membrane Transport Processes, Hrsg. Tosteson, D.C., Ovchinnikov, Y.A., Latorre, R. Raven, New York, 153-174

- 19 Catterall, W.A. (1977) J.Biol.Chem. 252, 8669-8676
- 20 Catterall, W.A. (1975) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 72, 1782-1786
- 21 Catterall, W.A., Morrow, C.S., Daly, J.W., Brown, G.B. (1981) J.Biol. Chem. 256, 8922-8927
- 22 Brown, G.B., Tieszen, S.C., Daly, J.W., Warnick, J., Albuquerque, E.X. (1981) Cell.Mol.Neurobiol. 1
- 23 Romey, G., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., Rochat, H., Miranda, F., Lissitzky, S. (1975) Biochem.Biophys.Res. Commun. 64, 115-121
- 24 Okamoto, H., Kunitaro, T., Yamashita, N. (1977) Nature 266, 465-468
- 25 Catterall, W.A. (1979) J.Gen.Physiol. 74, 375-392
- 26 Stallcup, W.B. (1977) Brain Res. 135, 37-53
- 27 Catterall, W.A. (1977) J.Biol.Chem. 252, 8660-8668
- 28 Ray, R., Morrow, C.S., Catterall, W.A. (1978) J.Biol.Chem. 253, 7307-7313
- 29 Wheeler, K.P., Barhanin, J., Lazdunski, M. (1982) Biochemistry 21, 5628-5634
- 30 Beress, L., Beress, R., Wunderer, G. (1975) FEBS Lett. 50, 311-314
- 31 Beress, L., Beress, R., Wunderer G. (1975) Toxicon 13, 359-367
- 32 Wunderer, G., Fritz, H., Wachter, E., Machleidt, W. (1976) Eur.J.Biochem. 68, 193-198
- 33 Beress, L., Wunderer, G., Wachter, E. (1977) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 985-988
- 34 Wunderer, G., Eulitz, M., (1978) Eur.J.Biochem. 89, 11-17
- 35 Martinez, G., Kopeyan, C., Schweitz, H., Lazdunski, M. (1977) FEBS Lett. 84, 247-252
- 36 Schweitz, H., Vincent, J.-P., Barhanin, J., Frelin, C., Linden, G., Hugnes, M., Lazdunski, M. (1981) Biochemistry 20, 5245-5252
- 37 Rathmayer, W., Beress, L. (1976) J.Comp.Physiol. 109, 373-382

- 38 Low, P.A., Wu, C.H., Narahashi, T. (1979) J.Pharmacol.Exp.Ther. 210, 417-421
- 39 Romey, G., Abita, J.P., Schweitz, H., Wunderer, G., Lazdunski, M. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci USA 73, 4055-5059
- 40 Bergman, C., Dubois, J.M., Rojas, E., Rathmayer, W. (1976), Biochim.Biophys.Acta 455, 173-184
- 41 Catterall, W.A., Beress, L. (1978) J.Biol.Chem. 253, 7393-7396
- 42 Jacques, Y., Fosset, M., Lazdunski, M. (1978) J.Biol.Chem. 253, 7383-7392
- 43 Stengelin, S. (1980) Dissertation, Universität Konstanz
- 44 Stengelin, S., Rathmayer, W., Wunderer, G., Beress, L., Hucho, F. (1981) Anal. Biochem. 113, 277-285
- 45 Hucho, F., Stengelin, S., Bandini, G. (1979) in: Recent Advances in Receptor Chemistry, Hrsg. Gualtieri, F., Giannella, M., Melchiorre, C., Elsevier /North-Holland Biomedical Press, 37-58
- 46 Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.-P. (1965) J.Mol.Biol. 12, 88-118
- 47 Rojas, E., Rudy, B. (1976) J.Physiol. London 262, 501-531
- 48 Ritchie, J.M., Rogart, R.B. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 211-215
- 49 Beneski, D.A., Catterall, W.A. (1980) Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 77, 639-642
- 50 Catterall, W.A., Beneski, D.A. (1980) J.Supramol.Struct. 14, 295-303
- 51 Ovchinnikov, Y., zitiert in: Newmark P. (1980) Nature 284, 659-660
- 52 Hartshorne, R.P., Catterall, W.A. (1981) Proc.Natl. Acad.Sci. USA 78, 4620-4624
- 53 Henderson, R., Wang, Y.H. (1972) Biochemistry 11, 4565-4569
- 54 Benzer, T.I., Raftery, M.A. (1973) Biochem.Biophys. Res.Comm. 51, 939-944

- 55 Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S.,  
Raftery, M.A., (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75,  
2606-2610
- 56 Agnew, W.S., Raftery, M.A., (1979) Biochemistry 18,  
1912-1919
- 57 Catterall, W.A., Morrow, C.S., Hartshorne, R.P. (1979)  
J.Biol.Chem. 254, 11379-11387
- 58 Barchi, R.L., Cohen, S.A., Murphy, L.E. (1980)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1306-1310
- 59 Barchi, R.L., Murphy, L.E. (1981) J.Neurochem. 36,  
2097-2100
- 60 Goldin, S.M., Rhoden, V., Hess, E.J. (1980)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 6884-6888
- 61 Hartshorne, R.P., Coppersmith J., Catterall, W.A. (1980)  
J.Biol.Chem. 255, 10572-10575
- 62 Villegas, R., Villegas, G.M., Barnola, F.V., Racker, E.  
(1977) Biochem.Biophys.Res.Comm. 79, 210-217
- 63 Tamkun, M.M., Catterall, W.A. (1981) J.Biol.Chem. 256,  
11457-11463
- 64 Talvenheimo, J.A., Tamkun, M.M., Catterall, W.A. (1982)  
J.Biol.Chem. 257, 11868-11871
- 65 Weigele, J.B., Barchi, R.L. (1982) Proc.Natl.Acad.  
Sci. USA 79, 3651-3655
- 66 Changeux, J.-P., Kasai, M., Lee, C.Y. (1970)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67, 1241-1247
- 67 Miledi, R., Molinoff, P., Potter, L.T. (1971) Nature  
229, 554-557
- 68 Schöffeniels, E., Nachmansohn, D. (1957) Biochim.  
Biophys.Acta 26, 1-23
- 69 Moreau, M., Changeux, J.-P. (1976) J.Mol.Biol. 106,  
457-467
- 70 Katz, B., Thesleff, S. (1957) J.Physiol. London, 138, 63-80

- 71 Rang, H.P., Ritter, J.M. (1970) Mol.Pharmacol. 6, 357-382
- 72 Vyskočil, F., Magazanik, L.G. (1972) Brain Res. 48, 417-419
- 73 Cohen, J.B., Weber, M., Changeux, J.-P. (1974) Mol.Pharmacol. 10, 904-932
- 74 Changeux, J.-P. (1981) Harvey Lect. 75, 85-254
- 75 Raftery, M.A., Schmidt, J., Clark, D.G. (1972) Arch.Biochem.Biophys. 152, 882-886
- 76 Cohen, J.B., Weber, M., Huchet, M., Changeux, J.-P. (1972), FEBS Lett. 26, 43-47
- 77 Duguid, J.R., Raftery, M.A. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 512-516
- 78 Sobel, A., Weber, M., Changeux, J.-P. (1977) Eur.J.Biochem. 80, 215-224
- 79 Schiebler, W., Lauffer, L., Hucho, F. (1977) FEBS Lett. 81, 39-42
- 80 Sugiyama, H., Changeux, J.-P. (1975) Eur.J.Biochem. 55, 505-515
- 81 Kasai, M., Changeux, J.-P. (1971) J.Membrane Biol, 6, 1-80
- 82 Hucho, F. (1981) Trends Biochem.Sci. 6, 242-244
- 83 Biesecker, G. (1973) Biochemistry 12, 4403-4409
- 84 Hucho, F., Layer, P., Kiefer, H.R., Bandini, G (1976) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 2624-2628
- 85 Reiter, M.J., Cowburn, D.A., Prives J.M., Karlin, A. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci USA 69, 1168-1172
- 86 Damle, V.N., McLaughlin, M., Karlin, A (1978) Biochem.Biophys.Res.Comm. 84, 845-851

- 87 Witzemann, V., Raftery, M.A. (1977) Biochemistry 16, 5862-5868
- 88 Hucho, F. (1979) FEBS Lett. 103, 27-32
- 89 Suarez-Isla, B.A., Hucho, F. (1977) FEBS Lett. 75, 65-69
- 90 Oswald, R.E., Changeux, J.-D. (1981) Biochemistry 20, 7166-7174
- 91 Oswald, R.E., Changeux, J.-P. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 3925-3929
- 92 Schiebler, W., Hucho, F. (1978) Eur.J.Biochem. 85, 55-63
- 93 Schindler, H., Quast, U. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 3052-3056
- 94 Takeuchi, A., Takeuchi, N. (1960) J.Physiol. London 154, 52-67
- 95 Neher, E., Steinbach, J.H. (1978) J.Physiol. London 277, 153-176
- 96 Katz, B., Miledi, R. (1972) J.Physiol. London 224, 665-699
- 97 Koblin, D.K., Lester, H.A. (1979), Mol.Pharmacol. 15, 559-580
- 98 Heidmann, T., Changeux, J.-P. (1981) FEBS Lett. 131, 239-245
- 99 Heidmann, T., Changeux, J.-P. (1979) Eur.J.Biochem. 94, 255-279
- 100 Sobel, A., Heidmann, T., Cartaud, J., Changeux, J.-P. (1980) Eur.J.Biochem. 110, 13-33
- 101 Krodel, E.K., Beckman, R.A., Cohen, J.B. (1979) Mol.Pharmacol. 15, 294-312
- 102 Elliot, J., Raftery, M.A. (1977) Biochem. Biophys.Res. Commun. 77, 1347-1353

- 103 Eldefrawi, M.E., Aronstam, R.S., Bakry, N.M.,  
Eldefrawi, A.T., Albuquerque, E.X. (1980) Proc.Natl.  
Sci. USA 77, 2309-2313
- 104 Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., Aronstam, R.S.,  
Maleque, M.A., Warnick, J.E., Albuquerque, E.X. (1980)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 7458-7462
- 105 Sobel, A., Heidmann, T., Hofler, J., Changeux, J.-P.  
(1978) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 510-514
- 106 Neubig, R.R., Krodell, E.K., Boyd, N.D., Cohen, J.B. (1979)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 690-694
- 107 Lauffer, L., Weber, K.-H., Hucho, F. (1979) Biochim.  
Biophys. Acta 587, 42-48
- 108 Schiebeler, W., Hucho, F. (1980) Biochim.Biophys.Acta  
597, 626-630
- 109 Edmonds, D.T. (1981) Trends Biochem.Sci. 6, 92-94
- 110 Hille, B. (1975) J.Gen.Physiol. 66, 535-560
- 111 Henderson, R., Ritchie, J.M., Strichartz, G.R. (1974)  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 3936-3940
- 112 Huang, L.-Y. M., Catterall, W.A., Ehrenstein, G. (1978)  
J.Gen.Physiol. 71, 397-410
- 113 Kostyuk, P.G. (1981) Biochim. Biophys.Acta 650, 128-150
- 114 Stengelin, S., Hucho, F. (1980) Hoppe-Seyler's Z.  
Physiol. Chem. 361, 577-585
- 115 Hubbard, A.L., Cohn, Z.A. (1972) J.Cell Biol. 55,  
390-405
- 116 Wallin, G. (1966) Nature 212, 521-522
- 117 Vincent, J., Balerna, M., Barhanin, J., Fosset, M.,  
Lazdunski, M. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77,  
1646-1650
- 118 Sabatini, M., Dipolo, R., Villegas, R. (1968)  
J.Cell Biol. 38, 176-183
- 119 Denburg, J.L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 282, 453-458

- 120 Chester, J., Lentz, T.L., Marquis, J.K., Mautner, H.G. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 3542-3546
- 121 Balerna, M., Fosset, M., Chicheportiche, R., Romey, G., Lazdunski, M. (1975) Biochemistry 14, 5500-5511
- 122 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275
- 123 Bonting, S.L., Simon, K.A., Hawkins, N.M. (1961) Arch.Biochem.Biophys. 95, 416-423
- 124 Eibl, H., Lands, W.E. (1969) Anal.Biochem. 30, 51-57
- 125 Laemmli, U.K. (1970) Nature 15, 680-685
- 126 Chowdry, V., Westheimer, F.H. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48, 293-325
- 127 Davis, G.E., Stark, G.R. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 66, 651-656
- 128 Peters, K., Richards, F.M. (1977) Ann.Rev.Biochem. 46, 523-551
- 129 Pilch, P.F., Czech, M.P. (1979) J.Biol.Chem. 254, 3375-3381
- 130 Massague, J., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 7137-7141
- 131 Kasuga, M., Van Obberghen, E., Nissley, S.P., Rechler, M.M. (1981) J.Biol.Chem. 256, 5305-5308
- 132 Rebois, R.V., Omedeo-Sale, F., Brady, R.O., Fishman, P.H. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 2086-2089
- 133 Hucho, F., Janda, M. (1974) Biochem. Biophys.Res.Comm. 57, 1080-1088
- 134 Möhler, H., Battersby, M., Richards, J.G. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1666-1670
- 135 Sieghart, W., Karobath, M. (1980) Nature 286, 285-287
- 136 Oswald, R.E., Changeux, J.-P. (1982) FEBS Lett. 139, 225-229

- 137 Agnew, W.S., Moore, A.C., Levinson, S.R., Raftery, M.A. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 860-866
- 138 Baker, J.B., Simmer, R.L., Glenn, K.C., Cunningham, D.D. (1979) Nature 278, 743-745
- 139 Linsley, P.S., Blifield, C., Wrann, M., Fox, C.F. (1979) Nature 278, 745-748
- 140 Ramos, S., Schuldiner, S., Kaback, H.R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1892-1896
- 141 Ramos, S., Grollman, E.F., Lazo, P.S., Dyer, S.A., Habis, W.H., Hardegree, M.C., Kaback, H.R., Kohn, L.D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4783-4787
- 142 Hazelbauer, G.L., Changeux, J.-P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1479-1483
- 143 Tsai, M.-C., Mansour, N.A., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Albuquerque, E.X. (1978) Mol. Pharmacol. 14, 787-803
- 144 Eldefrawi, A.T., Miller, E.R., Murphy, D.L., Eldefrawi, M.E. (1982) Mol. Pharmacol. 22, 72-81
- 145 Elliot, J., Raftery, M.A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1347-1353
- 146 Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., Mansour, N.A., Daly, J.W., Witkop, B., Albuquerque, E.X. (1978) Biochemistry 17, 5474-5484
- 147 Aronstam, R.S., Eldefrawi, A.T., Pessah, I.N., Daly, J.W., Albuquerque, E.X., Eldefrawi, M.E. (1981) J. Biol. Chem. 256, 2843-2850
- 148 Aronstam, R.S., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E. (1980) Biochem. Pharmacol. 29, 1311-1314
- 149 Muhn, P., Hucho, F. (1983) Biochemistry 23, im Druck
- 150 Quast, U., Schimerlik, M., Lee, T., Witzemann, V., Blanchard, S., Raftery, M.A. (1978) Biochemistry 17, 2405-2414
- 151 Weber, M., David-Pfeuty, T., Changeux, J.-P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3443-3447

- 152 Weiland, G., Taylor, P. (1979) Mol.Pharmacol. 15, 197-212
- 153 Muhn, P., Lauffer, L., Hucho, F. (1983) in: Mobility and Recognition in Cell Biology, Hrsg. Sund, H., Veeger, C., de Gruyter, Berlin, 393-407
- 154 Zaritsky, A., Macnab, R.M. (1981) J.Bacteriol. 147, 1054-1062
- 155 Zaritsky, A., Kihara, M., Macnab, R.M. (1981) J.Membrane Biol. 63, 215-231
- 156 Furth, A.J. (1980) Anal.Biochem. 109, 207-215
- 157 Jacobs, S., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1975) Biochem.Biophys.Res.Comm. 66, 687-692
- 158 Reynolds, J.A., Karlin, A. (1978) Biochemistry 17, 2035-2038

Anhang: Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

|                       |                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| ( <sup>3</sup> H-)ACh | ( <sup>3</sup> H-)Acetylcholin                                       |
| AChR                  | Acetylcholinrezeptor                                                 |
| ATP                   | Adenosintriphosphat                                                  |
| ATX I - III           | Anemonentoxine I - III aus<br><u>Anemonia sulcata</u>                |
| BSA                   | "Bovine serum albumin"; Rinderserum-<br>albumin                      |
| cmc                   | "Critical micelle concentration";<br>kritische Micellenkonzentration |
| DMSO                  | Dimethylsulfoxid                                                     |
| EDTA                  | Ethylendinitrilotetraessigsäure<br>Dinatriumsalz (Dihydrat)          |
| FFDNB                 | 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol                                       |
| FFDS                  | 4,4'-Difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfon                               |
| HEPES                 | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-<br>ethansulfonsäure                  |
| ( <sup>3</sup> H-)PCP | ( <sup>3</sup> H-) 1-(1-Phencyclohexyl)piperidin;<br>Phencyclidin    |
| PMSF                  | Phenylmethylsulfonylfluorid                                          |
| ScTX                  | Skorpiontoxin aus <u>Leiurus quinquestriatus</u>                     |
| TEMED                 | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                                     |
| Tris                  | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan                                     |

Prof. F. Hucho ermöglichte mir die Anfertigung dieser Arbeit.  
Für seine Hilfe, aber auch für seine Geduld, möchte ich ihm  
herzlich danken.

Siggi Stengelin führte mich in manche Geheimnisse der ATX I-  
Experimentierkunst ein.

Ein Dankeschön auch den Herren Dr. L. Beress und J. Zwick,  
beide Universität Kiel, für die Reinigung der Seeanemonentoxine.

Wesentlichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit haben  
schließlich auch alle Kolleginnen und Kollegen der AG Hucho.

Frau B. Hucho und Frau C. Richter danke ich für ihre Hilfe  
bei den Foto- bzw. Schreibarbeiten.

## LEBENS LAUF

Am 19. Juli 1953 wurde ich in Konstanz, Baden-Württemberg, als drittes von insgesamt sechs Kindern des Kaufleute-Ehepaars Eva-Maria Lauffer, geb. Flöter und Walter Lauffer geboren.

Nach dem Besuch der Pestalozzi-Grundschule in Friedrichshafen, Baden-Württemberg, von 1960 bis 1964 wechselte ich in das Graf Zeppelin Gymnasium, ebenfalls in Friedrichshafen, an dem ich 1972 das Reifezeugnis erhielt.

Zum Wintersemester 1972 begann ich den Diplom-Studiengang Biologie an der Universität Konstanz. Zwischenzeitlich zum Wehrdienst eingezogen, den ich von Oktober 1973 bis September 1974 in Sigma-ringen, Baden-Württemberg, ableistete, nahm ich im Wintersemester 1974 das Studium der Biologie an der Universität Konstanz wieder auf. Die Diplomarbeit fertigte ich im Labor von Prof. F. Hucho, damals Universität Konstanz, an. Im August 1978 schloß ich meine Studien an der Universität Konstanz mit dem Titel eines Diplombiologen ab.

Nach einem Aufenthalt in Südostasien begann ich im Mai 1979 im Labor von Prof. F. Hucho, Freie Universität Berlin, mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.







**D. GRÄBNER**

DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI



Gotenstraße 3  
8602 Altendorf bei Bamberg  
Telefon: 09545/8791